



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

TRANSMISSÃO DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM MONOFÁSICA APÓS O  
NASCIMENTO EM SUÍNOS

LAURA PINHEIRO FERNANDES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo  
Vilela  
Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

ORIENTADORA

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

2012

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

TRANSMISSÃO DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM MONOFÁSICA APÓS O  
NASCIMENTO EM SUÍNOS

LAURA PINHEIRO FERNANDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo  
Vilela  
Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

ORIENTADORA

Doutora Maria Constança Matias Ferreira  
Pomba

2012

LISBOA

Para o meu pai, a minha mãe  
e o meu irmão.

*Tenho saudades do futuro.*  
- Cesário Verde



## **Agradecimentos**

À professora Constança pela luz ao fundo do túnel quando a escolha do estágio parecia uma missão impossível. Do inesperado surgiu uma oportunidade e uma experiência para a vida. Pela paciência e amizade, até quando o trabalho durou até às duas da manhã.

À Natacha, à Adriana e à Madalena por toda a paciência, ajuda e valiosos ensinamentos no laboratório e fora dele. Um agradecimento especial à Madalena por ter aceite o meu embarque a bordo do projeto e ter recolhido as amostras utilizadas neste trabalho.

À Eng<sup>a</sup>. Paula Alves do Instituto de Tecnologia Química e Biologia pela disponibilidade para analisar os perfis de PFGE no BioNumerics e produzir os dendrogramas presentes nos resultados.

Ao Dr. Telmo Nunes pela ajuda na análise estatística deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, cujo financiamento tornou possível o projeto PTDC/SAU-SAP/113651/2009 “Use of cephalosporins in pigs – assessing the links between usage, resistance and food safety” onde se inseriu este trabalho.

À minha família, sem ela nada seria possível.

À Turma Biê, por toda a amizade e saudável loucura pelos corredores da FMV (e não só) por todos os dias me porem pelo menos um sorriso na cara. Em especial ao Diogo, porque nove anos é muito tempo.

À VETuna e à Olissippo, escolas de vida que fizeram de mim uma pessoa melhor.

Ao David por continuar a aturar-me nos bons e nos maus momentos, incluindo as esperas intermináveis à porta do laboratório e os momentos de frustração quando escrever não foi fácil...



## Resumo

### Transmissão de *Salmonella* Typhimurium monofásica após o nascimento em suínos

*Salmonella* continua a ser uma importante fonte de infecção gastrointestinal hoje em dia, e um serovar em particular, *S.* 4,[5],12:i:- ou *S.* Typhimurium monofásica, surgiu recentemente e disseminou-se rapidamente entre animais e humanos a nível mundial. É escasso o conhecimento da dinâmica de transmissão deste serovar em particular em suínos, pelo que o objetivo deste estudo foi averiguar a existência ou não de transmissão mãe-filho pós-nascimento de *S.* Typhimurium monofásica. As amostras foram obtidas de dez ninhadas provenientes de uma exploração intensiva industrial: da porca e de 7 leitões de cada ninhada após nascimento. O isolamento de *Salmonella* spp. foi efetuado de acordo com o protocolo descrito no ISO 6579:2002, Anexo D, e a serotipificação segundo o esquema de Kauffmann-White-Le Minor. O género e o serovar dos isolados foram confirmados através de PCR. A deteção fenotípica de resistência a 13 antibióticos foi efetuada de acordo com as diretrizes do “Clinical Laboratories Standards Institute” (CLSI). A deteção dos genes responsáveis pela resistência aos antibióticos foi efetuada por PCR, e o painel incluiu os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *aadA*, *aac*(3)-IV, *aac*(6)-Ib, *tet*(A), *tet*(B), *flor*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*. A extração de plasmídeos foi efetuada segundo um protocolo adaptado de Kehrenberger, Friederics, de Jong, Michael e Schwarz (2006) e o tamanho dos plasmídeos avaliado após linearização com a exonuclease S1. A clonalidade dos isolados foi determinada através de eletroforese em gel de campo-pulsado (PFGE) após restrição com a enzima XbaI com base no protocolo da PulseNet. Grupos clonais e subgrupos clonais foram definidos de acordo com os parâmetros recomendados por Carriço *et al* (2005).

Em três das 10 famílias amostradas (porca e pelo menos um leitão) detetaram-se isolados de *S.* Typhimurium monofásica. Todos os animais da família A, a mãe e 3 em 7 leitões da família B, e todos os elementos menos um da família D foram positivos (n=19). Dois padrões de resistência foram identificados: em 17 isolados detetou-se resistência a ácido nalidíxico, amoxicilina/ampicilina, estreptomicina, neomicina, sulfamidas e tetraciclina. Nas restantes 2 verificou-se uma resistência adicional a amoxicilina-ácido clavulânico. Quanto aos genes de resistência identificados, todos os isolados continham *bla*<sub>TEM</sub>, *tet*(B) e *sul2*, excetuando um negativo a *sul2*. Apenas um plasmídeo de 5600pb foi identificado em todas os isolados, e todos foram incluídas no mesmo grupo clonal.

Este estudo constitui a primeira demonstração de transmissão mãe-leitão de *S.* Typhimurium monofásica em suínos, e revela uma via de transmissão que poderá ser importante na manutenção e rápida disseminação deste serovar a nível mundial.

Palavras-chave: serovar 4,[5],12:i:-, PFGE, plasmídeos, suínos, transmissão, mãe-filho



## Abstract

### After birth transmission of monophasic *Salmonella* Typhimurium in pigs

*Salmonella* remains an important source of gastrointestinal infection nowadays, and a particular serovar, S. 4,[5],12:i:- or monophasic S. Typhimurium, has recently emerged and quickly disseminated through animals and humans worldwide. Little is known about the transmission dynamics of this particular serovar in pigs, and as such the aim of this study was to determine the existence or not of after birth mother-descendent transmission of monophasic S. Typhimurium. Samples were taken from ten litters of an intensive-production industrial farm: from the sow and 7 piglets of each litter after birth. *Salmonella* spp. was isolated according to the protocol described in ISO 6579:2002, Annex D, and serotyped according to the Kauffmann-White-Le Minor scheme. Genus and serovar of the isolates were confirmed by PCR. Phenotypic detection of resistance to 13 antimicrobials was done following Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI) guidelines. Detection of antimicrobial resistance genes was performed by PCR, and screening included the genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *aadA*, *aac*(3)-IV, *aac*(6)-Ib, *tet*(A), *tet*(B), *flor*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *qnrA*, *qnrB* and *qnrS*. Plasmid extraction was performed according to a protocol adapted from Kehrenberger, Friederics, de Jong, Michael e Schwarz (2006) and the plasmid size assessed after exonuclease S1 linearization. Clonality of the isolates was evaluated through pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with XbaI enzyme restriction based on the PulseNet protocol. Pulsed-field type clusters and subtypes were assessed according to the settings recommended by Carriço *et al* (2005).

Three of the 10 sampled families (sow and at least one piglet) were positive to monophasic S. Typhimurium. All the animals in family A, the mother and 3 out of 7 piglets in family B, and all but one element of family D were positive (n=19). Two resistance patterns were identified: in 17 isolates, resistance to nalidixic acid, amoxicillin/ampicillin, streptomycin, neomycin, compound sulphonamides and tetracycline was detected. The remaining 2 were additionally resistant to amoxicillin-clavulanic acid. As for the identified resistance genes, all isolates contained *bla*<sub>TEM</sub>, *tet*(B) and *sul2* except one, negative to *sul2*. Only one plasmid of 5600pb was identified in all the isolates, and every isolate was included in the same PFGE cluster.

To our knowledge, this study is the first report of sow-to-piglet transmission of monophasic S. Typhimurium and sheds light on a transmission pathway that might be important in the maintenance and rapid dissemination of this serovar worldwide.

Keywords: serovar 4,[5],12:i:-, PFGE, plasmids, swine, transmission, sow-to-piglet

## Índice

1.	Prefácio .....	1
2.	Introdução.....	1
2.1.	<i>Salmonella</i> spp. ....	1
2.1.1.	Generalidades .....	1
2.1.2.	Salmonelose .....	2
2.1.2.1.	Salmonelose em humanos.....	2
2.1.2.2.	Salmonelose em animais .....	4
2.1.2.3.	Vias de transmissão .....	4
2.1.3.	<i>Salmonella</i> serovar 4,[5],12:i:-, variante monofásica de <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	5
2.1.3.1.	Porquê monofásica?.....	6
2.1.3.2.	Epidemiologia .....	7
2.1.3.3.	Resistência aos antibióticos .....	8
2.1.3.4.	Técnicas de identificação de <i>S.</i> 4,[5],12:i:-.....	12
2.1.3.4.1.	Isolamento .....	12
2.1.3.4.2.	Identificação de género .....	13
2.1.3.4.3.	Identificação de serovar .....	13
2.1.3.4.4.	Caracterização de <i>S.</i> 4,[5],12:i:- .....	14
2.1.3.4.4.1.	Tipificação por bacteriófagos.....	14
2.1.3.4.4.2.	Caracterização de plasmídeos .....	14
2.1.3.4.4.3.	Eletroforese em gel por campo pulsado (PFGE) .....	15
2.1.3.4.4.4.	Tipagem de sequência multilocus (MLST) .....	16
2.1.3.4.4.5.	Análise de repetições em tandem de número variável multilocus (MLVA) .....	17
2.1.3.5.	Vias de transmissão .....	17
3.	Objetivos.....	18
4.	Materiais e Métodos .....	18
4.1.	Origem das amostras .....	18
4.2.	Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp .....	19
4.2.1.	Serotipificação .....	22
4.3.	Susceptibilidade a antibióticos .....	23
4.3.1.	Teste de difusão de disco .....	24
4.3.2.	Determinação da concentração inibitória mínima .....	24

4.4.	Extração de ADN .....	25
4.5.	Reação de polimerização em cadeia (PCR) .....	25
4.5.1.	Confirmação de género .....	26
4.5.2.	Confirmação de serovar Typhimurium e diferenciação da variante monofásica .....	27
4.5.3.	Deteção de genes de resistência a tetraciclinas – <i>tet(A)</i> e <i>tet(B)</i> .....	28
4.5.4.	Deteção de genes de resistência a aminoglicosídeos .....	28
4.5.4.1.	Estreptomicina - <i>aadA</i> .....	28
4.5.4.2.	Gentamicina – <i>aac(3)-IV</i> .....	28
4.5.4.3.	Gentamicina – <i>aac(6)-Ib</i> .....	28
4.5.5.	Deteção de genes de resistência ao florfenicol - <i>floR</i> .....	29
4.5.6.	Deteção de genes de resistência a sulfamidas .....	29
4.5.6.1.	<i>sul1</i> .....	29
4.5.6.2.	<i>sul2</i> .....	29
4.5.7.	Deteção de genes de resistência ao trimetoprim – <i>dhfrA1</i> .....	30
4.5.8.	Deteção de genes de resistência a beta-lactâmicos .....	30
4.5.8.1.	Beta-lactamases TEM, OXA e SHV .....	30
4.5.8.2.	Beta-lactamase CTX-M .....	31
4.5.9.	Deteção de genes de resistência a quinolonas e fluoroquinolonas .....	31
4.5.9.1.	<i>qnrA</i> e <i>qnrS</i> .....	31
4.5.9.2.	<i>qnrB</i> .....	31
4.6.	Extração e linearização de plasmídeos .....	31
4.7.	Clonalidade – PFGE .....	33
4.8.	Análise estatística .....	34
5.	Resultados .....	35
6.	Discussão .....	40
7.	Conclusão .....	43
8.	Bibliografia .....	45
Anexo I – Critérios de susceptibilidade aplicados nos testes de susceptibilidade a antibióticos.....		57
Anexo II – Diâmetro dos halos de inibição e CIMs dos isolados de <i>S. 4,[5],12:i:-</i> das famílias A, B e D . .....		59
Anexo III – Resumo do poster apresentado na 3 <sup>rd</sup> ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens 2012, França, em 26 de Junho de 2012 .....		61
Anexo IV – Artigo publicado no <i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i> em 17 de Agosto, 2012 .....		67

## Índice de figuras

Figura 1 - Genes codificantes para as fases flagelares e genes associados com o mecanismo de inversão de <i>Salmonella</i> spp. ....	6
Figura 2 - Expressão da primeira fase flagelar em <i>Salmonella</i> spp. ....	6
Figura 3 - Expressão da segunda fase flagelar em <i>Salmonella</i> spp. ....	6
Figura 4 - Esquema de isolamento de <i>Salmonella</i> spp. praticado no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (adaptado de Centeno, 2010) .....	20
Figura 5 - Comparação entre placas de MSRV (48h±3h) com crescimento positivo para <i>Salmonella</i> spp e negativo. ....	21
Figura 6 -Morfologia de <i>Salmonella</i> spp em placas de Hektoen e XLD (24h±3h) .....	21
Figura 7 - Exemplo de eletroforese em agarose de produtos de PCR para detecção de <i>invA</i> .....	27
Figura 8 - Exemplo de eletroforese em agarose dos produtos do multiplex PCR de detecção de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> .....	30
Figura 9 -Exemplo de eletroforese em agarose de plasmídeos não digeridos .....	32
Figura 10 - Famílias portadoras de S. 4,[5],12:i:-.....	35
Figura 11 - Eletroforese em agarose de plasmídeos linearizados da família B. ....	37
Figura 12 - Regressão linear para cálculo do peso dos plasmídeos da família B.....	38
Figura 13 - Dendrograma de identificação de grupo clonal – coeficiente de tolerância 1,7%.....	39
Figura 14 - Dendrograma de identificação de subgrupo clonal – coeficiente de tolerância 2,5% .....	39

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Morfologia de <i>Salmonella</i> spp e outros géneros em TSI Agar (adaptado de Domingos, 2010) .....	22
Tabela 2 - Soros utilizados durante a serotipificação de <i>S. Typhimurium</i> monofásica.....	23
Tabela 3 - Sequências, tamanho (pares de bases) e referência dos oligonucleótidos utilizados .....	25
Tabela 4 - Padrão fenotípico e genotípico de resistência a antibióticos, plasmídeos e subgrupos clonais das famílias A, B e D.....	36
Tabela 5 - Quantificação de leitões positivos e negativos a <i>S. 4,[5],12:i:-</i> relativamente à positividade da porca progenitora .....	40
Tabela 6 - Intervalos de susceptibilidade aplicados nos testes de susceptibilidade a antibióticos .....	57
Tabela 7 - Diâmetro dos halos de inibição e CIM dos isolados de <i>S. 4,[5],12:i:-</i> das famílias A, B e D ...	59

## Índice de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro

ARNt – Ácido ribonucleico de transferência

AMC – Amoxicilina-ácido clavulânico

AML – Amoxicilina

AMP – Ampicilina

BIOHAZ – Painel da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar sobre Perigos Biológicos, “European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards”

CA-SFM – Comité para o Antibiógrama da Sociedade Francesa de Microbiologia, “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie”

CAZ – Ceftazidima

CDC – Centros para a Prevenção e Controlo de Doenças, “Centers for Disease Control and Prevention”

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Instituto de Standards de Laboratórios Clínicos, “Clinical Laboratories Standards Institute”

CN – Gentamicina

CTX – Cefotaxima

dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfato

DT – Tipo Definitivo, “Definitive Type”

ECDC – Centro Europeu para o Controlo e Prevenção de Doenças, “European Center for Disease Control and Prevention”

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EFSA – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, “European Food Safety Authority”

ELISA – Ensaio Imunoabsorvente Associado a Enzima, “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

ENR – Enrofloxacin

ESBL – Beta-lactamases de espectro alargado, “Extended Spectrum Beta-Lactamases”

FFC – Florfenicol

FMV-UTL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa

FOX – Cefoxitina

ISO – Organização Internacional para a Estandarização, “International Standardization Organization”

kpb – Quilopares de bases.

LRAB – Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas

MLST – Tipagem por Sequenciação Multilocus, “Multilocus Sequence Typing”  
MLVA – Análise de Repetições em Tandem de Número Variável Multilocus, “Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis”  
MSRV – Rappaport-Vassiliadis Modificado Semi-sólido, “Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis”  
N – Neomicina  
NA – Ácido Nalidíxico  
pb – Pares de bases  
PCR – Reação de Polimerização em Cadeia, “Polymerase Chain Reaction”  
PFGE – Eletroforese em Campo Pulsado, “Pulsed-Field Gel Electrophoresis”  
RVS – Caldo Rappaport-Vassiliadis com Soja, “Rappaport-Vassiliadis Broth with Soy”  
S3 – Sulfonamidas compostas  
ST – Sequência Tipo, “Sequence Type”  
STR – Estreptomicina  
SxT – Sulfametoxazol-trimetoprim  
TAE – Tris-Acetato EDTA  
TBE – Tris-Borato EDTA  
TE - Tetraciclina  
TSI – Triplo Açúcar Ferro, “Triple Sugar Iron”  
UPGMA – Método de Agrupamento pelas Médias Aritméticas Não Ponderadas, “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”  
UV - Ultravioleta  
VNTR – Repetições em Tandem de Número Variável, “Variable Number Tandem Repeats”  
W – Trimetoprim  
WHOCC-Salm – Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa em *Salmonella* da Organização Mundial de Saúde, “World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*”  
XLD – Xilose Lisina Deoxicolato, “Xylose Lysine Deoxycholate”  
XNL – Ceftiofur

## 1. Prefácio

O meu estágio curricular foi iniciado em Setembro de 2011 no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (LRAB), da Faculdade de Medicina de Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), sob a supervisão da Professora Constança Pomba, onde desenvolvi o meu conhecimento e competências nas áreas da Bacteriologia e Resistência aos Antibióticos e Biocidas, e concluído em Junho de 2012 após um total aproximado de 1280 horas. Ao longo do estágio participei em vários trabalhos, a decorrerem em simultâneo com o meu, para preparação e otimização das várias técnicas laboratoriais utilizadas.

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi desenvolvido durante o estágio no âmbito do Projeto PTDC/SAU-SAP/113651/2009 da Fundação para a Ciência e Tecnologia, e parte dos resultados foram divulgados num poster que foi apresentado na 3<sup>rd</sup> ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens, em Junho de 2012 em França, intitulado 'Vertical Transmission of Monophasic *Salmonella* Typhimurium in Pigs' (Anexo III).

Em Agosto de 2012 foi publicado um pequeno artigo no Journal of Antimicrobial Chemotherapy, intitulado 'Immediate after birth transmission of epidemic *Salmonella enterica* Typhimurium monophasic strains in pigs is a likely event' (Anexo IV).

## 2. Introdução

### 2.1. *Salmonella* spp.

#### 2.1.1. Generalidades

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Consiste em bactérias de coloração Gram-negativa com motilidade, em forma de bacilo, anaeróbias facultativas, maioritariamente flageladas e não esporuladas, com dimensões de 2-3 x 0.4-0.6 µm (Yan *et al*, 2003; Pui *et al*, 2011), e inclui duas espécies, *Salmonella enterica* e *S. bongori*. Para além da espécie, o género *Salmonella* é ainda dividido em subespécie e serovar, com mais de 2500 serovares reconhecidos e validados pelo Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa em *Salmonella* da Organização Mundial de Saúde (WHOC-Salm), sendo a maioria pertencente à subespécie *Salmonella enterica enterica* (Grimont & Weill, 2007) onde estão incluídos a maioria dos serovares patogénicos para o Homem (European Center for Disease Control and Prevention [ECDC], 2011; European Food Safety Authority [EFSA] & ECDC, 2012; Kurosawa *et al*, 2012).

Cada serovar tem características próprias que auxiliam á sua diferenciação. A base para a identificação consiste em testes serológicos, ou serotipificação. Estes são direccionados para



a detecção de três grupos diferentes de antígenos presentes na superfície da bactéria (Grimont & Weill, 2007; EFSA Panel on Biological Hazards [BIOHAZ], 2010):

- O antígeno-O (ou antígeno somático) consiste num componente externo da parede de lipopolissacárido da bactéria. Os diferentes serovares são categorizados em grupos somáticos de acordo com os antígenos-O presentes. Inicialmente representados por letras (por exemplo, *Salmonella* Typhimurium pertencente ao grupo B), os grupos somáticos são hoje em dia designados pelos números dos próprios antígenos (no caso de *S. Typhimurium*, grupo 4).
- O antígeno-H (ou antígeno flagelar) é a flagelina, o componente principal dos flagelos. A maioria dos serovares é capaz de expressar duas flagelinas, ou fases flagelares, diferentes, existindo um mecanismo génico que permite favorecer a produção de uma ou de outra e que confere à salmonela um carácter bifásico. Este mecanismo será abordado adiante. No entanto, outras configurações podem ocorrer, como serovares com três ou mais fases, monofásicos e até sem nenhuma fase flagelar.
- Por fim, o antígeno-Vi é um fator de virulência relacionado com a presença de cápsula que pode ocorrer apenas em três serovares (*Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi C e *Salmonella* Dublin).

A combinação dos diferentes antígenos detetados resulta numa fórmula antigénica que está associada a um determinado serovar. A fórmula apresenta primeiro os diferentes antígenos-O presentes no serovar, seguidos dos antígenos-H associados à primeira fase flagelar, e por fim os antígenos-H da segunda fase flagelar, acrescentando-se o antígeno-Vi caso exista.

É possível a existência de mais do que um serovar com a mesma fórmula. Nestes casos, são utilizadas outras características para distinção desses serovares, tais como variações bioquímicas, o hospedeiro de onde foi isolado e a patogenicidade, entre outras (Grimont & Weill, 2007). Mesmo dentro dos próprios serovares é possível a distinção de diferentes estirpes com recurso a várias técnicas, como a tipificação por bacteriófagos que permite classificar estirpes dentro do mesmo serovar em fagotipos consoante a lise ou não da bactéria quando exposta a um conjunto de vírus bacteriófagos. Este método e outros, serão abordados mais adiante em maior detalhe.

## **2.1.2. Salmonelose**

### **2.1.2.1. Salmonelose em humanos**

Em humanos, a infeção por *Salmonella* pode resultar em diferentes manifestações clínicas, sendo as mais comuns a febre tifóide ou paratifóide e a gastroenterite (Coburn, Grassl & Finlay, 2007; Pui *et al*, 2011).

A febre tifóide ou paratifóide é causada por serovares especificamente adaptados ao hospedeiro humano – Typhi e Paratyphi (Yan *et al*, 2003) – com capacidade para atravessar a barreira intestinal e invadir as placas de Peyer. A partir das placas, estes serovares são capazes de se evadir à resposta do sistema imunitário através da colonização de células pertencentes ao sistema reticuloendotelial, nomeadamente macrófagos, onde a bactéria persiste, disseminando-se por outros tecidos (Ohl & Miller, 2001; Coburn *et al*, 2007). Os sintomas da doença incluem febre, mal-estar e dor abdominal como os mais comuns, possivelmente acompanhados de enxaqueca, mialgia, náusea, anorexia e obstipação. A ocorrência de diarreia está geralmente associada a infeções em imunodeprimidos (Coburn *et al*, 2007). Existe uma probabilidade de 10% de recaída (devido à persistência nos macrófagos), complicações (incluindo encefalopatia, hemorragia gastrointestinal e perfuração intestinal) e morte (Pui *et al*, 2011). O tratamento primário consiste na administração de fluoroquinolonas e é eficaz na maioria dos casos, diminuindo a duração da infeção, a taxa de eliminação, a morbilidade e a mortalidade.

A gastroenterite, ou salmonelose, está associada aos restantes serovares, chamados não-tifóides e passíveis de infetar vários hospedeiros, como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (Ohl & Miller, 2001; Yan *et al*, 2003; Foley & Lynne, 2008). Estes aderem ao bordo apical das células epiteliais intestinais e invadem o meio intracelular, mas geralmente não têm capacidade para continuar a migrar, resultando numa infeção autolimitante localizada apenas a nível digestivo. Estas salmonelas induzem a produção de citocinas quando em contacto com a bordadura em escova do intestino, o que promove a migração de neutrófilos para o lúmen intestinal e a secreção de um exsudado rico em proteínas responsável pela diarreia associada à doença (Coburn *et al*, 2007). A sintomatologia típica consiste em diarreia, cólicas, vômito e febre, desaparecendo, em casos normais, ao fim de 2 a 7 dias sem necessitar de tratamento (Foley & Lynne, 2008). Algumas estirpes mais agressivas podem no entanto causar formas mais graves da doença, com bacteriemia e infeção de outros tecidos, resultando por exemplo em meningite, pneumonia ou osteomielite (Foley & Lynne, 2008; Pui *et al*, 2011). Os grupos em risco de formas agravadas de salmonelose são as crianças, os idosos e os imunodeprimidos, requerendo antibioterapia caso manifestem sintomas de doença invasiva (Foley & Lynne, 2008; Pui *et al*, 2011). Os antibióticos recomendados são as fluoroquinolonas ou a ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, no caso das crianças.

O período de excreção de *Salmonella* após infeção pode prolongar-se após resolução clínica da doença e tornar o hospedeiro um portador assintomático crónico (Pui *et al*, 2011), sobretudo quando o hospedeiro tem alguma alteração a nível biliar (Monack, 2012). Este fenómeno é mais comum na febre tifóide, onde 1 a 4% dos convalescentes que não foram submetidos a nenhum tratamento se tornam portadores crónicos por mais de um ano, mas também ocorre em infeções por serovares não tifóides, com 0,1% das infeções não tratadas

resultando num período de excreção superior a um ano (Pui *et al*, 2011). O estatuto de portador crónico pode ter consequências importantes para a saúde pública, especialmente se a pessoa em causa trabalha na indústria agroalimentar, onde pode atuar como um foco de disseminação de *Salmonella* (Pui *et al*, 2011).

#### **2.1.2.2. Salmonelose em animais**

Em animais a salmonelose é a forma de doença mais comum, apesar de alguns serovares estarem associados a infeções mais severas (como *S. Dublin* em bovinos, *S. Choleraesuis* em suínos e *S. Typhimurium* em ratos) (Coburn *et al*, 2007; EFSA & ECDC, 2012). No entanto, é comum a infeção ser apenas subclínica e os animais atuarem como portadores assintomáticos, intermitentes ou crónicos, possibilitando uma rápida disseminação da bactéria no grupo através das suas fezes.

Em suínos é mais comum os animais serem portadores assintomáticos do que apresentarem sinais clínicos, dificultando a deteção de *Salmonella* nesta espécie (EFSA & ECDC, 2012). As infeções clínicas por serovares não-tifóides são geralmente desenvolvidas pelos animais com idade entre as 6 e 12 semanas, enquanto animais mais velhos se tornam portadores activos (Mastroeni & Maskell, 2006), com infeções subclínicas e constante excreção de *Salmonella*.

#### **2.1.2.3. Vias de transmissão**

Apesar de se apresentar em declínio nos países ditos desenvolvidos, as infeções por *Salmonella* continuam a ser uma das infeções gastrointestinais de origem alimentar mais comuns a nível europeu (ECDC, 2011) e mundial (Organização Mundial de Saúde, 2005). A principal via de transmissão é a via fecal-oral, e a infeção por *Salmonella* está vulgarmente associada ao contacto com um ambiente e produtos alimentares contaminados com fezes ou até contacto direto com portadores animais e humanos, sendo transmissível entre diversas espécies animais (Hendriksen, Orsel, Wagenaar, Miko & van Duikeren, 2004; Boyen *et al*, 2008; Pui *et al*, 2011; EFSA & ECDC, 2012). Pontos principais de preocupação são a contaminação de áreas de preparação de alimentos e a contaminação cruzada com matéria fecal. Na sua origem estarão más práticas de higiene, contaminação do equipamento ou dos próprios manipuladores, e processamento ou armazenamento inadequados (Carrasco, Morales-Rueda & García-Gimeno, 2011; EFSA & ECDC, 2012). Outra via descrita consiste na transmissão por via aérea. As vias aéreas superiores e os pulmões já foram previamente identificados como portas de entrada de infeções por *Salmonella* (Oliveira, Garcia, Carvalho & Givisiez, 2007), e a transmissão de *S. Typhimurium* a curta distância entre leitões reportada (Boyen *et al*, 2008). Esta via parece ser serovar-dependente, no entanto carece de estudos mais aprofundados (Oliveira *et al*, 2007; Boyen *et al*, 2008).

Uma outra via tem um grande peso na prevalência de salmonelose em humanos. A transmissão vertical de serovares não-tifóides apenas foi detetada em aves até à data (Gopinath, Carden & Monack, 2012), mas constitui um importante problema de saúde pública devido principalmente à disseminação de *Salmonella* pelos ovos. Os ovos são alimentos vulgarmente consumidos crus ou presentes em preparados não ou mal cozinhados, e são o vector mais importante de salmonelose humana, seguido dos produtos derivados de suínos (Gantois *et al*, 2009; EFSA & ECDC, 2012). Além disso, os pintos provenientes de ovos infetados com *Salmonella* podem desenvolver uma infeção clínica ou tornar-se portadores assintomáticos e promover a transmissão horizontal entre o bando (Gantois *et al*, 2009; Gopinath *et al*, 2012). Existem duas formas de transmissão de *Salmonella* ao ovo: a transmissão vertical propriamente dita, onde a *Salmonella* penetra os reservatórios e as membranas internas do ovo através do contacto com as paredes dos órgãos reprodutivos da ave infetados com *Salmonella*; e a transmissão através da contaminação do ovo com fezes da ave durante ou logo após a postura do ovo (Gantois *et al*, 2009). A existência de transmissão mãe-filho de serovares não-tifóides noutras espécies animais encontra-se pouco estudada atualmente. Alguns autores (Belœil *et al*, 2004; Funk & Gebreyes, 2004; Nollet *et al*, 2005) referem que, em suínos, o estatuto de portadora de *Salmonella* ou não da porca-mãe poderá influenciar o estatuto dos leitões descendentes e que é necessária a realização de estudos para confirmar ou desmentir esta relação

### **2.1.3. *Salmonella* serovar 4,[5],12:i:-, variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium**

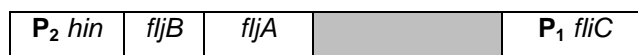
*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:- é um serovar não-tifoide que tem adquirido importância crescente nos últimos anos. Pertencente ao grupo O:4,5, Echeita, Aladueña, Cruchaga & Usera (1999) questionaram a proveniência deste serovar: se seria uma versão monofásica de serovares previamente identificados, sendo os mais comuns *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i;1,2) e *Salmonella* Lagos (4,[5],12:i;1,5), ou se seria um serovar totalmente novo. Utilizando a tipificação por bacteriófagos, determinaram que os isolados do serovar 4,[5],12:i:- apresentavam um perfil semelhante a outro perfil previamente associado a *S. Typhimurium*, DT U302.

Em 2001, Echeita, Herrera e Usera confirmaram a relação entre o serovar 4,[5],12:i:- e o serovar Typhimurium através da identificação na região intergénica presente no “cluster” que codifica as flagelinas, *fliB-fliA*, de uma sequência de inserção IS200, típica de *S. Typhimurium* (Burnens *et al*, 1997), e de um fragmento de 162pb associado a *S. Typhimurium* DT U302. Posteriormente, através de eletroforese em gel por campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, PFGE) e análise de plasmídeos, de la Torre *et al* (2003) estabeleceram pontos de comparação adicionais entre os serovares, sugerindo a designação de variante monofásica de *S. Typhimurium*.

### 2.1.3.1. Porquê monofásica?

Num serovar bifásico, os dois antígenos-H são codificados cada um pelo seu gene respetivo (*fliC* e *fljB*), um promotor individual para cada fase (**P<sub>1</sub>** e **P<sub>2</sub>**), um repressor (*fljA*) e o gene duma recombinase (*hin*) associada ao promotor da segunda fase (**P<sub>2</sub>**) (Aldridge *et al*, 2006; Yamamoto & Kutsukake, 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Genes codificantes para as fases flagelares e genes associados com o mecanismo de inversão de *Salmonella* spp.



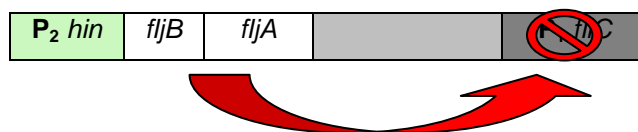
Como já foi referido, apenas uma das flagelinas é expressa a cada momento. A flagelina correspondente à primeira fase é codificada pelo gene *fliC* e a correspondente à segunda fase pelo gene *fljB*. A expressão de uma ou de outra flagelina é condicionada pela ação da recombinase Hin, cuja função é inverter a posição de **P<sub>2</sub>**. Quando a primeira fase está a ser expressa, o promotor **P<sub>2</sub>** encontra-se invertido, e apenas *fliC* é transcrito (Figura 2) (Aldridge *et al*, 2006; Yamamoto & Kutsukake, 2006).

Figura 2 - Expressão da primeira fase flagelar em *Salmonella* spp.



Quando o promotor **P<sub>2</sub>** se encontra alinhado com os restantes genes, promove a transcrição não só de *fljB*, mas também do repressor *fljA*. Este repressor atua sobre o gene *fliC* e inibe a sua transcrição, resultando na expressão apenas da segunda fase flagelar (Figura 3) (Aldridge *et al*, 2006; Yamamoto & Kutsukake, 2006).

Figura 3 - Expressão da segunda fase flagelar em *Salmonella* spp.



No caso da variante monofásica de *S. Typhimurium*, o gene *fljB* não existe (Echeita *et al*, 2001; Soyer *et al*, 2009), tendo sido deletado num evento genético que transformou a estirpe do serovar original em monofásica. É ainda relevante o facto de pelo menos a linhagem americana manter o gene da recombinase, enquanto noutras foi deletado juntamente com o *fljB* e *fljA* (Soyer *et al*, 2009), sugerindo a ocorrência de diferentes deleções em diferentes linhagens de *S. Typhimurium*.

### 2.1.3.2. Epidemiologia

O serovar 4,[5],12:i:- foi identificado pela primeira vez em Portugal, isolado a partir de carcaças de galinha em 1986 (Machado & Bernardo, 1990), e foi posteriormente detetado em suínos e produtos derivados em Espanha (Echeita *et al*, 1999), disseminando-se ao longo dos anos pelo resto da Europa e pelo menos por mais quatro continentes em vários hospedeiros, incluindo humanos, tornando-se um dos serovares mais prevalentes a nível europeu (Echeita *et al*, 2001; Agasan *et al*, 2002; Garaizar *et al*, 2002; de la Torre *et al*, 2003; Tavechio, Ghilardio & Fernandes, 2004; Amavisit, Boonyawiwat & Bangtrakulnont, 2005; Soyer *et al*, 2009; Switt, Soyer, Warnick & Wiedmann, 2009; Tavechio *et al*, 2009; BIOHAZ, 2010; Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010; Lucarelli *et al*, 2010; Tennant *et al*, 2010; Antunes, Mourão, Pestana & Peixe, 2011; ECDC, 2011; EFSA & ECDC, 2012). O número de casos e surtos epidémicos relacionados com *S. Typhimurium* monofásica detetados a partir de 1990 reflete a recente emergência e expansão deste serovar; no entanto, a nomenclatura utilizada para reportar este serovar não era uniforme e algumas infeções poderiam ser reportadas apenas como *S. Typhimurium*, o que poderá ter levado a subestimar os casos reais. No entanto, foi promovido um esforço de uniformização da nomenclatura (BIOHAZ, 2010), e os casos reportados de 2010 no relatório conjunto da EFSA e do ECDC (2012) tornaram a *S. 4,[5],12:i:-* no quarto serovar mais reportado a nível europeu como responsável por casos de salmonelose em humanos, constituindo 1,5% das infeções confirmadas por *Salmonella* e representando 1.407 casos. A nível dos suínos o serovar foi igualmente colocado entre os dez mais comuns, representando o segundo serovar mais isolado (9,3%) nos animais em si e o terceiro mais comum em carne de porco (7,4%).

Dentro das várias estirpes isoladas por toda a Europa, duas variantes diferentes sobressaíram, constituindo duas linhagens com características distintas. A variante espanhola foi a inicialmente estudada por Echeita *et al* (1999) e onde incidiram os primeiros trabalhos sobre o serovar *S. 4,[5],12:i:-* (Guerra, Laconcha, Soto, González-Hevia & Mendoza, 2000; Echeita *et al*, 2001; Garaizar *et al*, 2002; del Cerro, Soto & Mendoza, 2003; de la Torre *et al*, 2003). Esta linhagem surgiu do fagotipo U302 de *S. Typhimurium*, apresenta uniformidade dos padrões de PFGE, com todas as estirpes semelhantes em 80% (de la Torre *et al*, 2003) e apresenta um padrão de multirresistência bastante variável – o mais frequente sendo amoxicilina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprim – devido à associação dos genes de resistência a estes antibióticos a elementos genéticos móveis, nomeadamente integrões associados a plasmídeos de grandes dimensões (> 120kpb) (Switt *et al*, 2009). Os integrões consistem em elementos genéticos capazes de capturar cassetes de genes e integrá-las num local de recombinação associado (Fluit, 2005), sendo estes a razão principal da variabilidade desta linhagem. Já a variante europeia, mais recente, é sobretudo associada ao fagotipo DT 193,

mas a ocorrência de outros fagotipos simultaneamente, e a existência de mais do que um grupo clonal de PFGE, apesar da existência de um perfil predominante, sugere a emergência de vários clones de *S. Typhimurium* monofásica ao mesmo tempo, em vez da evolução de apenas um (Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010). Estes clones contêm o mesmo padrão de tetrarresistência de base – amoxicilina, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina – apesar dos diferentes fagotipos, e estudos revelaram não só que os genes responsáveis pelo padrão são diferentes da variante espanhola como estão localizados no cromossoma (Lucarelli *et al*, 2010; Antunes *et al*, 2011).

Após a emergência da *S. Typhimurium* monofásica, o serovar foi reportado em Portugal em três estudos e na participação nacional em dois estudos de base promovidos pela EFSA. Vieira-Pinto, Tenreiro e Martins (2006) obtiveram 3 isolados de suínos após abate, num estudo sobre o relacionamento entre o isolamento de *Salmonella* em diversos tecidos e a contaminação exterior da carcaça na linha de abate. Os perfis obtidos por PFGE revelaram um baixo grau de semelhança entre os isolados que, apesar de terem origem na mesma exploração, foram isolados em datas diferentes. Durante o estudo de base sobre a prevalência de *Salmonella* em porcos de abate em 2006-2007 da EFSA (2008), 17 em 658 amostras recolhidas em matadouros portugueses, 10.9% dos isolados, foram positivas ao isolamento de *S. 4,[5],12:i:-*, enquanto no estudo de base sobre a prevalência em suínos reprodutores e de produção um ano mais tarde (EFSA, 2009) 2 isolados foram obtidos, sendo a amostragem bastante inferior (n=38), constituindo 5.3% dos isolados de *Salmonella* e presente em 13.3% das instalações. Antunes *et al* (2011), detetaram as duas variantes do serovar, espanhola e europeia, demonstrando a presença de estirpes de ambas as linhagens no país. O estudo mais recente (Gomes-Neves *et al*, 2012) incidiu na contaminação cruzada com *Salmonella* nos matadouros portugueses, onde os 3 isolados de *S. 4,[5],12:i:-* foram incluídos no mesmo grupo clonal que 8 isolados de *S. Typhimurium* DT 104, um fagotipo aparentado com o U302 (Rabsch *et al*, 2002).

#### **2.1.3.3. Resistência aos antibióticos**

A resistência aos antibióticos põe em causa a eficácia do tratamento de infeções causadas por vários microrganismos e *Salmonella* não é exceção, sendo particularmente relevante nos casos de doença invasiva onde o recurso a antibióticos é necessário e uma antibioterapia eficaz potencialmente vital para a sobrevivência do doente. A resistência a vários grupos de antibióticos tem-se manifestado em vários serovares, incluindo em *S. Typhimurium* monofásica (Ng, Mulvey, Martin, Peters & Johnson, 1999; Gebreyes & Altier, 2002; Yang *et al*, 2002; del Cerro *et al*, 2003; Randall, Cooles, Osborn, Piddock & Woodward, 2004; Miko, Pries, Schroeter & Helmuth, 2005; Chiu *et al*, 2006; Shahada, Amamoto, Chuma, Shirai & Okamoto, 2007; Gunell *et al*, 2009; Dahshan, Shahada, Chuma, Moriki & Okamoto, 2010; Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010; Lucarelli *et al*, 2010; Caleja

*et al*, 2011; Hur, Jawale & Lee, 2011; Veldman *et al*, 2011). A ocorrência de resistência a antibióticos num serovar em expansão é motivo para preocupação, representando uma ameaça à saúde pública (BIOHAZ, 2010). É por isso crucial o conhecimento dos diferentes mecanismos de resistência e detecção dos genes responsáveis necessários à vigilância da resistência antimicrobiana e a determinação do melhor curso terapêutico a tomar.

Os aminoglicosídeos, grupo de que fazem parte a estreptomicina e a gentamicina, são antibióticos com um espectro de ação relativamente alargado, englobando Gram negativos, estafilococos e micobactérias (Shakil, Khan, Zarrili & Khan, 2008). São antibióticos cujo mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica através da ligação ao ARN ribossómico 16S, impedindo a ligação do ARNm ao ribossoma (Shakil *et al*, 2008). Vários mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos têm sido estudados, mas o mecanismo mais relevante em *Salmonella* consiste na alteração do antibiótico através de ação enzimática (Hur *et al*, 2011). Estas enzimas encontram-se frequentemente associadas a elementos genéticos móveis como os plasmídeos, facilitando a disseminação desta resistência inter e intraespécie (Shaw, Rather, Hare & Miller, 1993; Shakil *et al*, 2008), e são classificadas em três grupos: acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases (Shaw *et al*, 1993).

A resistência à estreptomicina é uma das mais comuns em *Salmonella* (Madsen, Aarestrup & Olsen, 2000) e no serovar Typhimurium monofásico (BIOHAZ, 2010). Encontra-se presente nas duas variantes, tendo a particularidade de ser codificada por genes diferentes consoante a linhagem de origem, espanhola ou europeia. Na variante espanhola, a resistência é causada por uma adeniltransferase codificada pelo gene *aadA*, que é frequentemente associado a integrões (Madsen *et al*, 2000; Lucarelli *et al*, 2010). Por outro lado, os genes determinantes de resistência à estreptomicina na variante europeia são fosfotransferases de base cromossómica, *strA* e *strB* (Lucarelli *et al*, 2010).

Outro aminoglicosídeo cuja resistência é relevante em *Salmonella* é a gentamicina. Este é um dos aminoglicosídeos mais utilizados (Shakil *et al*, 2008), pelo que a ocorrência de resistência a este antibiótico constitui um grave risco de falha terapêutica. Um dos genes responsáveis por esta resistência em *Salmonella* é o gene *aac(3)-IV*, codificante de uma acetiltransferase com a particularidade de induzir resistência não só à gentamicina como à apramicina (Chaslus-Dancla, Martel, Carrier, Lafont & Courvalin, 1986). Este gene, associado a plasmídeos, apenas foi detetado nos isolados de *S. Typhimurium* monofásica pertencentes ao fagotipo U302, até agora não fazendo parte do repertório genético das estirpes de linhagem europeia (BIOHAZ, 2010).

Os beta-lactâmicos são outra classe de antibióticos bacteriocidas, tendo um espectro de ação variável consoante o grupo e a geração do antibiótico (MacGowan, 2011). O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da produção de componentes necessários para a formação da parede bacteriana. Os beta-lactâmicos imitam a estrutura de um dos substratos



necessários à produção do peptidoglicano que forma a parede bacteriana, mas não são hidrolisáveis pelas enzimas, e a associação entre a enzima e o falso substrato induz um bloqueio da via metabólica de síntese da parede, eventualmente levando à entrada de água na célula e à lise (Babic, Hujer & Bonomo, 2006; Hur *et al*, 2011).

Tal como para os aminoglicosídeos, o mecanismo principal de resistência aos beta-lactâmicos em *Salmonella* consiste na produção de enzimas, denominadas beta-lactamases, capazes de degradarem estes antibióticos (Hur *et al*, 2011). Estas enzimas podem ser categorizadas com base na sequência de aminoácidos da enzima – classes Ambler de A a D – e no perfil de substratos e inibidores – grupos Bush de 1 a 4 – (Babic *et al*, 2006). As beta-lactamases detetadas em *S. Typhimurium* monofásica são sobretudo pertencentes à classe Ambler A, grupo Bush 2b (penicilinas de largo espectro, susceptíveis ao ácido clavulânico), e conferem resistência às penicilinas como a ampicilina e a amoxicilina (Babic *et al*, 2006). As mais comuns pertencem ao grupo TEM, podem ter localização cromossômica ou móvel, e estão presentes nas duas variantes do serovar, tendo a beta-lactamase sido classificada como TEM-1 (BIOHAZ, 2010; Lucarelli *et al*, 2010). Outro grupo importante de enzimas é o das beta-lactamases de espectro alargado (“extended spectrum beta-lactamases”, ESBLs), pertencentes à classe Ambler A e grupo Bush 2be. As ESBLs têm sido cada vez mais encontradas em bactérias de Gram-negativo, e *Salmonella* não é excepção. Uma família emergente de ESBLs em particular, a CTX-M, tem-se disseminado por vários géneros, conferindo resistência a cefalosporinas de 3ª geração como a cefotaxima e a ceftriaxona (Babic *et al*, 2006; Hur *et al*, 2011), e já foi detetada em *Salmonella* (Madec, Doublet, Ponsin, Cloeckert & Haenni, 2011), o que pode levar a falhas críticas na terapêutica de infeções invasivas em crianças, onde estes antibióticos são primeira escolha.

As fluoroquinolonas são antibióticos de largo espectro utilizados no tratamento eficaz de uma vasta gama de infeções em humanos e animais (Hopkins, Davies & Threlfall, 2005). O mecanismo de ação das fluoroquinolonas consiste na inibição de duas enzimas, a ADN girase e a topoisomerase IV. Estas enzimas são indispensáveis à síntese do ADN bacteriano, sendo responsáveis pela regulação do super enrolamento das cadeias de ADN e pela sua separação para o processo de replicação. Estas funções são inativadas quando as fluoroquinolonas se ligam às subunidades que compõem estas enzimas, impedindo a transcrição e replicação do ADN e eventualmente causando a morte da bactéria (Hopkins *et al*, 2005; Fàbrega, Sánchez-Céspedes, Soto & Villa, 2008). Tendo em conta que o mecanismo de ação das quinolonas é transversal a todos os antibióticos desta classe, qualquer mecanismo de resistência manifestado nos locais de ligação entre as fluoroquinolonas e as enzimas poderá afetar todos os compostos (em graus variáveis), independentemente de ter sido gerado pela exposição a uma quinolona mais antiga, como o ácido nalidíxico, ou a uma mais recente, como a enrofloxacin (Hopkins *et al*, 2005). A forma

mais conhecida de resistência consiste precisamente no aparecimento de mutações pontuais nos genes das subunidades que codificam a girase e a topoisomerase. No entanto, outros determinantes de resistência às quinolonas foram identificados em plasmídeos (Hopkins *et al*, 2005), entre os quais se incluem os genes *qnr*. Estes genes codificam uma proteína que interage com a ADN girase e que fornece algum grau de proteção à enzima da ação das quinolonas, conferindo um nível diminuído de susceptibilidade que potencia o aparecimento de resistência às fluoroquinolonas (Hopkins *et al*, 2005). Estes determinantes já foram encontrados em *Salmonella* (Gunell *et al*, 2009; Veldman *et al*, 2011), apesar de não terem ainda sido detetados em *S. Typhimurium* monofásica.

O cloranfenicol é um antibiótico de utilização controversa devido à toxicidade nos precursores de várias linhas celulares (Schwarz, Kehrenberg, Doublet & Cloaekaert, 2004), sendo de especial relevância a ocorrência de anemia aplástica (Spinosa, Górnaiak & Bernardi, 2006). Em humanos, o cloranfenicol encontra-se reservado para um número limitado de doenças muito graves, como meningites bacterianas. Já a utilização em animais de produção foi banida na União Europeia, por preocupações relacionadas com a persistência do antibiótico nas carcaças e a manifestação dos efeitos adversos nos consumidores. É utilizado, como substituto, um derivado disponível apenas para medicina veterinária, o florfenicol, no controlo de infeções do trato respiratório (Schwarz *et al*, 2004), pois a anemia aplástica encontra-se relacionada com um grupo químico que apenas se encontra presente no cloranfenicol (Spinosa *et al*, 2006). O mecanismo de ação consiste no bloqueio da atividade ribossomal através da ligação à subunidade 50S, impedindo a ligação e a movimentação dos substratos no centro ativo do ribossoma e o fim da tradução (Xaplanteri, Andreou, Dino & Kalpaxis, 2003). A resistência a estes antibióticos em *Salmonella* consiste sobretudo na ação de bombas de efluxo (Hur *et al*, 2011) associadas aos genes *cmiA* e *floR*, localizados em plasmídeos, e é relativamente frequente nas estirpes U302 de *S. Typhimurium* monofásica (del Cerro *et al*, 2003; BIOHAZ, 2010).

De largo espectro de ação, as tetraciclinas são utilizadas em larga escala sobretudo a nível veterinário, encontrando-se, no entanto, a sua eficácia reduzida hoje em dia pela prevalência elevada de resistência a estes antibióticos (Chopra & Roberts, 2001). O seu mecanismo de ação consiste na inibição da associação do ARNt ao ribossoma, impedindo a produção das proteínas necessárias ao metabolismo da bactéria (Chopra & Roberts, 2001). A resistência às tetraciclinas está associada a bombas de efluxo (Hur *et al*, 2011). Estas são codificadas pelos genes *tet* e são comuns em *S. Typhimurium* monofásica, existindo a associação entre variantes específicas do gene, *tet(A)* e *tet(B)*, às linhagens espanhola e europeia respetivamente (BIOHAZ, 2010).

As sulfonamidas e a sua combinação com o trimetoprim apresentam um espectro de ação que alcança tanto bactérias de Gram-positivo como de Gram-negativo. Ambos os compostos são direcionados para atuarem sobre a via metabólica do folato, responsável

pela síntese de ADN, em dois pontos diferentes: as sulfonamidas atuam como um substrato alternativo ao ácido para-aminobenzoico, a base para a síntese de pirimidinas, inibindo competitivamente a ação da enzima dihidropteroato-sintase; o trimetoprim exerce a mesma ação mas mais à frente na via metabólica, atuando como substituto do dihidrofolato na enzima respetiva, a dihidrofolato-redutase (Olliaro, 2001). Apesar de existir resistência cromossômica relacionada com mutação dos genes codificantes das enzimas-alvo (Olliaro, 2001), o principal mecanismo de resistência a estes antibióticos consiste na substituição por inteiro dessas enzimas, susceptíveis, por outras que têm afinidade reduzida para os antibióticos (Hur *et al*, 2011). Apenas três genes foram descobertos até agora como responsáveis pela resistência às sulfonamidas, *sul1*, *sul2* e *sul3*, enquanto mais de 20 genes determinantes de resistência ao trimetoprim (*dfr*) foram reportados (Aleksun & Levy, 2007). O gene *sul1* e os diferentes *dfr* encontram-se descritos na variante espanhola de *S. 4,[5],12:i:-*, associados a integroões, enquanto o gene *sul2* tem sido reportado na variante europeia (BIOHAZ, 2010).

#### **2.1.3.4. Técnicas de identificação de *S. 4,[5],12:i:-***

##### **2.1.3.4.1. Isolamento**

As técnicas de monitorização da presença de *Salmonella* spp. em vários tipos de amostras (alimentos, alimentação animal e produção primária) estão incluídas na legislação europeia, no Regulamento No 1441/2007 da Comissão Europeia (BIOHAZ, 2010), consistindo em protocolos formulados pela Organização Internacional para a Estandardização (ISO). O protocolo EN ISO 6579 (Anónimo, 2002) é o preconizado para o processamento de amostras de alimentos e de alimentação animal e o Anexo D do mesmo ISO (Anónimo, 2007) para o processamento de amostras provenientes da produção primária, como fezes e pó, distinguindo-os os meios seletivos utilizados. Para o processamento de amostras de alimentos e alimentação animal, dois meios líquidos seletivos são utilizados – Caldo Rappaport-Vassiliadis com Soja (“Rappaport Vassiliadis Broth with Soy”, RVS) e Muller-Kauffmann Tetrationato com novobiocina. Para as amostras de produção primária, um meio semi-sólido, baseado no RVS mas com agar incorporado, o agar Rappaport Vassiliadis Semi-sólido (“Modified Semi-Solid Rappaport Vassiliadis”, MSRV), é o preconizado, adicionando-se como fator de seleção a motilidade – migração a partir do ponto de inoculação. A variante monofásica de *S. Typhimurium* produz apenas uma fase flagelar, o que poderia influenciar negativamente o isolamento a partir de meios seletivos, nomeadamente de MSRV dada a componente semi-sólida; no entanto, o serovar mantém-se móvel e o isolamento pode ser executado de acordo com os protocolos em vigor (BIOHAZ, 2010).

#### 2.1.3.4.2. Identificação de género

Vários métodos podem ser utilizados para a confirmação do género como *Salmonella* spp. A ISO 6579 (Anónimo, 2002) preconiza a realização de testes bioquímicos, com a possibilidade de classificação até ao nível de subespécie. Com o objetivo de diminuir o tempo necessário para o diagnóstico em comparação com os métodos convencionais, vários investigadores (Malorny, Hoorfar, Bunge & Helmuth, 2003; Salehi, Mahzounieh & Saeedzadeh, 2005; Kim & Bhunia, 2008; Levin, 2009) estudaram diversas técnicas, tais como novos meios seletivos, protocolos de isolamento diferentes, e vários protocolos de PCR e ELISA, entre outros. Um dos métodos mais utilizado e mais facilmente aplicado consiste na deteção do gene *invA*. O gene *invA* é um gene de virulência que codifica uma proteína essencial para a invasão das células epiteliais do intestino, encontrando-se presente na larga maioria dos isolados de diferentes serovares (Bülte & Jakob, 1995; Malorny *et al*, 2003; Salehi *et al*, 2005), incluindo *S. Typhimurium* monofásica (Guerra *et al*, 2000; Antunes *et al*, 2011). Um estudo interlaboratorial efetuado por Malorny *et al* (2003) determinou o gene *invA* como sendo o mais específico na distinção entre *Salmonella* e outros géneros comparativamente a outros genes de virulência também utilizados.

#### 2.1.3.4.3. Identificação de serovar

A serotipificação é o método de eleição para a determinação de serovares, como já foi referido, mas a confirmação da ausência de uma fase não é 100% comprovável com base apenas em testes serológicos. A EFSA (BIOHAZ, 2010) recomenda a utilização de métodos genotípicos para a distinção de *S. Typhimurium* monofásica de outros serovares do mesmo grupo O e fase flagelar i que o serovar *Typhimurium*, e a confirmação da ausência da fase *fljB*, nomeadamente através de um protocolo de multiplex PCR desenvolvido por Tennant *et al* (2010). Este protocolo consiste na utilização de dois pares de oligonucleótidos, cada um com uma função específica:

- Um par é responsável pela amplificação da região intergénica localizada entre as duas fases flagelares, *fljB-fljA*, igual ao usado por Echeita *et al* (2001). No serovar *Typhimurium* e na variante monofásica, esta região intergénica tem especificamente 1000pb, enquanto nos outros serovares são amplificadas regiões com apenas 250pb (Echeita *et al*, 2001; Tennant *et al*, 2010).
- O segundo par (Vanegas & Joys, 1995) é direcionado para a amplificação do gene *fljB*, dando origem a um produto de PCR de 1389pb no caso de se tratar de serovares bifásicos como o *Typhimurium* ou não amplificando o gene em caso de ausência, confirmando assim o carácter monofásico do isolado.

O PCR multiplex é um método rápido e permite a distinção entre *S. Typhimurium*, variante monofásica e os outros serovares, com a exceção de *S. Farsta* (Tennant *et al*, 2010). Este serovar apenas se distingue de *S. Typhimurium* devido à segunda fase flagelar (e,n,x) e é o

único serovar não relacionado com Typhimurium que também produz uma banda de 1000pb. No entanto, este é um serovar muito raro (Tennant *et al*, 2010; BIOHAZ, 2010) e a distinção é possível através de serotipificação.

#### **2.1.3.4.4. Caracterização de S. 4,[5],12:i:-**

É possível aprofundar o estudo de isolados de S. 4,[5],12:i:- para além da identificação do serovar, existindo várias técnicas laboratoriais que se podem utilizar. Apesar de pertencerem ao mesmo serovar, estirpes isoladas em locais diferentes, ou até do mesmo animal, podem ter características distintas cujo estudo é relevante do ponto de vista epidemiológico, permitindo determinar com maior precisão a relação entre diferentes isolados (Tenover *et al*, 1995; Yan *et al*, 2003; Tizard, 2004; Gebreyes *et al*, 2009; BIOHAZ, 2010).

##### **2.1.3.4.4.1. Tipificação por bacteriófagos**

A tipificação por bacteriófagos consiste na exposição da bactéria em estudo a um painel de bacteriófagos predefinido e na observação da susceptibilidade a cada vírus através da ocorrência de lise, formando um fagotipo que pode então ser comparado entre diferentes estirpes (Rabsch *et al*, 2002).

O serovar 4,[5],12:i:- produz padrões de lise iguais aos do serovar Typhimurium, não havendo influência por parte da ausência do segundo flagelo nos padrões obtidos (Echeita *et al*, 1999; Amavisit *et al*, 2005; Hopkins *et al*, 2010), e mais de 200 tipos definitivos (“definitive type”, DT) são reconhecidos hoje em dia para o serovar Typhimurium (Liebana *et al*, 2002; Rabsch *et al*, 2002; BIOHAZ, 2010). Vários padrões têm sido identificados na variante monofásica, e alguns têm sido associados a linhagens com características específicas: a variante ‘espanhola’ identificada inicialmente por Echeita *et al* (1999) é associada ao padrão U302 (BIOHAZ, 2010), enquanto os clones que têm sido detetados em outros países europeus (Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010; Lucarelli *et al*, 2010) estão associados sobretudo aos padrões DT 193 e DT 120.

Apesar de permitir uma boa diferenciação noutros serovares (como S. Enteritidis) (Nauerby, Pedersen, Dietz & Madsen, 2000), em áreas de prevalência alta de um determinado padrão esta técnica não é suficientemente discriminatória para estudos epidemiológicos (Liebana *et al*, 2002), e um DT pode ser partilhado por várias linhagens clonais diferentes (Hopkins *et al*, 2010).

##### **2.1.3.4.4.2. Caracterização de plasmídeos**

Os plasmídeos consistem em elementos móveis de ADN de dupla cadeia de tamanho variável e de replicação autónoma do ADN cromossómico bacteriano (Turner, Cooper & Lenski, 1998). Para além da transmissão horizontal entre bactérias de diferentes clones e

até diferentes espécies, através de conjugação bacteriana (Boyd & Hartl, 1997; Carattoli, 2009), a transmissão vertical de plasmídeos também é possível, conferindo aos descendentes o mesmo conteúdo plasmídico que a bactéria original (Millemann, Lesage, Chaslus-Dancla & Lafont, 1995; Carattoli 2009). Esta facilidade de transmissão, combinada com a integração de outros elementos móveis nos próprios plasmídeos, torna-os uma das principais formas de propagação de diferentes genes de virulência e resistência a antibióticos, possibilitando a adaptação das bactérias a ambientes previamente hostis (Carattoli, 2003; Carattoli, 2009; Anjum *et al*, 2011). O estudo dos plasmídeos presentes nas estirpes microbianas consiste num dos meios de comparação da relação entre diferentes isolados, tendo feito parte da metodologia em estudos prévios de transmissão mãe-filho (Tannock, Fuller, Smith & Hall, 1990) e de determinação da relação entre isolados, em conjugação com outras técnicas (Stubbs, Hickman-Brenner, Cameron & Farmer, 1994; Millemann *et al*, 1995; Guerra *et al*, 2000; del Cerro *et al*, 2003; Tavechio *et al*, 2009; Hauser *et al*, 2010; Ido *et al*, 2011).

Vários parâmetros são utilizados na caracterização de plasmídeos, como o tamanho, os genes de virulência ou antibiorresistência inseridos no plasmídeo e os genes de controlo da replicação. No entanto, apenas o estudo dos genes de controlo da replicação permite uma classificação formal dos plasmídeos, dado que fazem parte da estrutura necessária para uma replicação bem-sucedida e portanto constituindo-se como os genes mais estáveis do plasmídeo (Carattoli, 2009). A identificação dos genes de controlo da replicação era geralmente feita com base em testes de incompatibilidade – dois plasmídeos com os mesmos genes de controlo de replicação não se conseguem propagar de forma estável na mesma célula, pelo que, durante a conjugação de duas bactérias, apenas o plasmídeo previamente presente se mantém na bactéria recetora (Carattoli, 2009). Hoje em dia, a abordagem consiste na amplificação da região de replicação, ou replicão, através de PCR, pelo esquema desenvolvido por Carattoli *et al* (2005), otimizado para a deteção dos principais replicões. Ainda assim, o melhor método de estudo dos plasmídeos é a sequenciação total do ADN plasmídico, o único que permite a identificação de novas famílias de plasmídeos (Carattoli, 2009).

A presença de plasmídeos nas diferentes linhagens de *S. 4,[5],12:i:-* é bastante variável, com a deteção de grandes plasmídeos (mais de 90kpb) de virulência e resistência nalgumas estirpes e a ausência total destes elementos genéticos noutras (Switt *et al*, 2009; BIOHAZ, 2010; Anjum *et al*, 2011)

#### **2.1.3.4.4.3. Eletroforese em gel por campo pulsado (PFGE)**

Considerado o “gold standard” das técnicas de diferenciação molecular de *Salmonella* (Levin, 2009; Wattiau, Boland & Bertrand, 2011), a PFGE é uma técnica altamente discriminatória utilizada frequentemente em estudos epidemiológicos (Vieira-Pinto *et al*,

2006; Weill *et al*, 2006; Soyer *et al*, 2009; Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2010a; CDC, 2010b; Hopkins *et al*, 2010; Long *et al*, 2010; Mody *et al*, 2011; Gomes-Neves *et al*, 2012).

Através da clivagem com enzimas de restrição, a PFGE permite obter um perfil de restrição do ADN bacteriano e comparar os diferentes perfis entre si para avaliar a clonalidade (Tenover *et al*, 1995), possibilitando a visualização de fragmentos de ADN de dimensão muito grande (de 10 a 800 kpb) (Olive & Bean, 1999). Ao longo dos anos, vários métodos e critérios foram desenvolvidos para classificar os perfis e determinar qual o seu grau de semelhança (Tenover *et al*, 1995; McDougal *et al*, 2003; Carriço *et al*, 2005). Perfis com seis ou menos bandas de diferença (Tenover *et al*, 1995) ou 80% de semelhança entre si (Carriço *et al*, 2005) são considerados da mesma linhagem genética, e portanto parte do mesmo grupo clonal. Dentro do grupo clonal podem estar presentes clones derivados do mesmo evento epidemiológico; estes clones apresentam um grau de semelhança mais elevado, com apenas três ou menos bandas de diferença (Tenover *et al*, 1995) ou 97% de semelhança entre si (Carriço *et al*, 2005), e são classificados em subgrupos clonais.

Um dos problemas associados a esta técnica consiste na dificuldade de comparação interlaboratorial, dada a variabilidade de protocolos (Levin, 2009; Wattiau *et al*, 2011). Uma rede internacional, a “PulseNet”, foi desenvolvida com o fim de harmonizar a metodologia entre diferentes laboratórios e possibilitar a partilha de dados e a comparação entre perfis de vários géneros microbianos, incluindo *Salmonella* (Hunter *et al*, 2005; Gatto *et al*, 2006; Boxrud, Monson, Stiles *et al*, 2010; Lucarelli *et al*, 2010).

A PFGE é uma técnica muito utilizada no estudo de *S. 4,[5],12:i:-*, e um perfil, STYMXB.131 de acordo com a nomenclatura da PulseNet, foi detetado a circular pela Europa, associado ao fagotipo mais comum, DT 193 (Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010; Lucarelli *et al*, 2010), refletindo a capacidade de adaptação deste serovar.

#### **2.1.3.4.4.4. Tipagem de sequência multilocus (MLST)**

A tipagem de sequência multilocus, ou MLST (“multilocus sequence typing”), consiste na amplificação de fragmentos nucleotídicos internos de 7 genes estruturais e comparação das sequências obtidas com todas as sequências previamente identificadas, designando números como identificação dos alelos para cada locus. A combinação numérica dos 7 alelos forma a sequência tipo (“sequence type”, ST), e é utilizada no estudo da clonalidade e da divergência genética entre diferentes estirpes (Aanensen & Spratt, 2005).

O primeiro esquema desenvolvido para *Salmonella* teve como objetivo o estudo comparativo de *S. Typhi* com os serovares não-tifoides (Kidgell *et al*, 2002). Apesar de não ter tido sucesso em diferenciar os isolados de *S. Typhi* entre si (Kidgell *et al*, 2002), a discriminação entre os serovares não-tifoides foi satisfatória, e este protocolo continua a ser o mais

utilizado hoje em dia (Wattiau *et al*, 2011), com uma base de dados acessível online (<http://mlst.ucc.ie/mlst>).

Outros esquemas foram criados ao longo dos anos (Soyer *et al*, 2009; Liu *et al*, 2011; Wattiau *et al*, 2011; Achtmann *et al*, 2012), baseados em outros grupos de genes, e apesar de esquemas mais recentes terem um poder discriminatório superior, incluindo um protocolo com sensibilidade superior ao “gold standard” na avaliação de clonalidade, PFGE (Liu *et al*, 2011), o protocolo de Kidgell *et al* (2002) tem sido o usado nos estudos da variante monofásica de *S. Typhimurium* (BIOHAZ, 2010; Antunes *et al*, 2011), com deteção de diferentes ST típicos de *S. Typhimurium* na variante.

#### **2.1.3.4.4.5. Análise de repetições em tandem de número variável multilocus (MLVA)**

Semelhante à MLST, a análise de repetições em tandem de número variável multilocus, ou “multilocus variable number of tandem repeat analysis” (MLVA), incide na amplificação por PCR de vários loci de ADN repetitivo existentes em genes ou regiões intergénicas (van Belkum, 2007). Estas repetições, chamadas repetições em tandem de número variável (“variable number tandem repeats”, VNTR) podem variar entre diferentes estirpes, não só no número de repetições presentes, mas também na própria unidade de repetição. Quando comparada com outras técnicas moleculares, a MLVA apresenta um poder de discriminação entre estirpes superior à MLST e semelhante à PFGE, com a vantagem relativamente à PFGE de ser um método baseado em PCR (Malachowa *et al*, 2005). No entanto, cada espécie, e por vezes serovar, requer uma otimização do protocolo de base, incluindo a escolha de primers apropriados e ajuste dos protocolos de PCR, e podem ocorrer artefactos devido a erros de cópia das repetições durante o PCR (van Belkum, 2007).

Lindstedt, Heir, Gjernes e Kapperud (2003) desenvolveram o protocolo de MLVA para *Salmonella* como recurso para discriminar, com sucesso, entre estirpes de *S. Typhimurium* com um perfil de PFGE aparentemente homogéneo, continuando este protocolo a ser utilizado hoje em dia, incluindo no estudo da variante monofásica (Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010; Kurosawa *et al*, 2012).

#### **2.1.3.5. Vias de transmissão**

A *S. Typhimurium* monofásica apresenta uma patogenia semelhante aos outros serovares não-tifóides e encontra-se associada, como estes serovares, sobretudo a uma via de transmissão fecal-oral. A porta de entrada mais importante consiste na via oral. Apesar das evidências que apontam para a existência de uma via de transmissão aérea, esta não foi reportada até à data em *S. Typhimurium* monofásica. O serovar monofásico foi detetado nos linfonodos mesentéricos e no íleo em suínos, (Vieira-Pinto *et al*, 2006), locais que não devem ser subestimados como potenciais fontes de contaminação durante o abate e que podem promover a disseminação de *Salmonella*, não só na carcaça como também na



própria linha de abate (Vieira-Pinto *et al*, 2006; Boyen *et al*, 2008). Outros locais de isolamento, onde já foi detetada *S. Typhimurium* (tonsilas e linfonodos mandibulares), poderão também ser importantes, dada a relação entre os dois serovares (Vieira-Pinto *et al*, 2006).

Tal como para os restantes serovares, é completamente desconhecido o papel da transmissão mãe-descendente na propagação de *S. Typhimurium* monofásica. Tendo em conta o peso crescente deste serovar no quadro geral da salmonelose e a sua relação com o serovar *Typhimurium* – outro serovar de grande importância (EFSA & ECDC, 2012) –, *S. 4,[5],12:i:-* é um potencial ponto de partida para estudar esta via de transmissão e determinar se esta via tem alguma influência na disseminação deste serovar (e potencialmente de outros) em suínos.

### **3. Objetivos**

O objetivo deste estudo foi determinar a existência ou não de transmissão de *Salmonella Typhimurium* monofásica entre porca e leitão logo após o nascimento, com recurso a métodos fenotípicos e genotípicos para comparar os isolados e avaliar semelhança entre si. Para tal definiu-se como necessário:

- Isolar e identificar *Salmonella Typhimurium* monofásica na amostra em estudo (n=80) com base em métodos standardizados (Anónimo, 2007), e confirmar o género e o serovar por PCR para determinar a existência ou não de famílias (porca e pelo menos um descendente) portadoras.

- Determinar os padrões de resistência a antibióticos com base nos métodos fenotípicos, de difusão de disco e de determinação da concentração inibitória mínima segundo as indicações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), e genotípicos através de PCR e multiplex PCR.

- Extrair e determinar o tamanho de plasmídeos presentes nos isolados após linearização.

- Avaliar a clonalidade através de PFGE e classificar em grupo e subgrupo clonal.

Outro objetivo consistiu no estudo da porca portadora de *S. Typhimurium* monofásica como fator de risco para os descendentes serem também portadores, com recurso ao Teste Exacto de Fisher.

### **4. Materiais e Métodos**

#### **4.1. Origem das amostras**

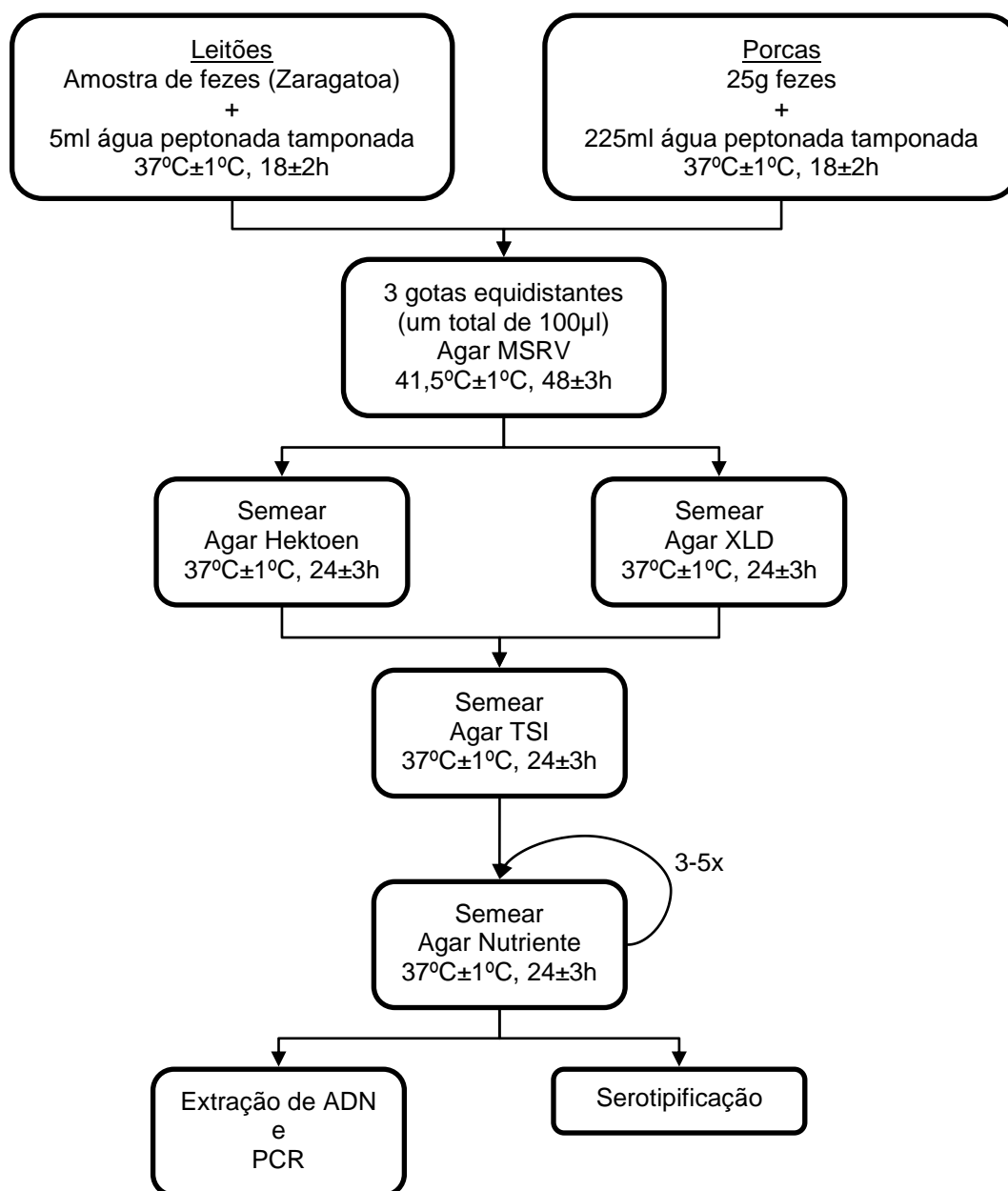
As amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram obtidas no âmbito do Projeto PTDC/SAU-SAP/113651/2009, e foram recolhidas de uma exploração industrial de produção suinícola intensiva. A exploração localiza-se no Alentejo, distrito de Évora, sendo

uma exploração de reprodução e cria com 600 porcas reprodutoras selecionadas dentro da própria exploração. A maternidade é composta por dois pavilhões, com quatro salas cada pavilhão e quarenta porcas por sala chão em cimento com grelha, ventilado por ventoinhas e camas compostas por tiras de jornal. Os pavilhões são desinfetados após cada ciclo produtivo com desinfetante comercial; no entanto, o vazio sanitário não é completo. A exploração apresenta um rodilúvio à entrada, tem em prática programas de controlo de pragas e os efluentes são tratados em lagoas. As porcas são alimentadas com granulado não medicamentado produzido pela empresa onde se insere a exploração e armazenado num barracão regularmente desratizado e desbaratizado, com alguma circulação de aves silvestres, e a água é proveniente de um furo próprio, tratada e desinfetada. Cada porca e respetiva ninhada não têm contacto com outros animais, estando dispostas em quatro filas por cada sala com as divisórias entre os diferentes 'ninhos' compostas por muros de cimento e chapa. Dez porcas e sete leitões da ninhada de cada porca foram escolhidos ao acaso e amostras colhidas após o nascimento. No total, 10 porcas com uma idade aproximada de 2 anos e 70 leitões com 0 a 36 horas foram incluídos no estudo. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (LRAB) – FMV.

#### **4.2. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp**

Para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp recorreu-se a uma adaptação do protocolo constante do EN ISO 6579:2002, Anexo D (Anónimo, 2007) (Figura 4).

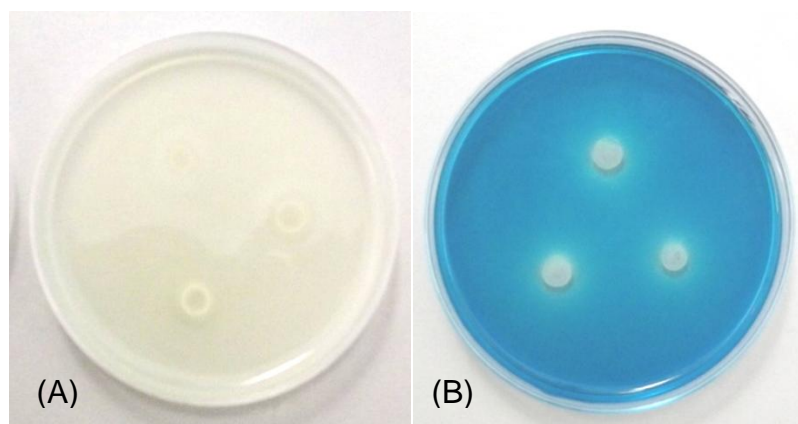
Figura 4 - Esquema de isolamento de *Salmonella* spp. praticado no Laboratório de Resistência a Antibióticos e Biocidas (Anônimo, 2007)



De acordo com o tamanho do animal, procedeu-se a diferentes métodos de recolha de fezes e de enriquecimento. Em animais adultos, uma amostra de 25g de fezes foi recolhida do chão do alojamento para um saco de “Stomacher” e pré-enriquecida com 225 ml de água peptonada tamponada (Biokar, Beauvais, França) um meio líquido não seletivo, à temperatura ambiente (diluição 1:10). As amostras de leitões consistiram em zaragatoas rectais, colocadas em 5ml de água peptonada tamponada. Posteriormente, os dois tipos de amostras foram homogeneizados e incubados a 37°C±1°C durante 18h±2h.

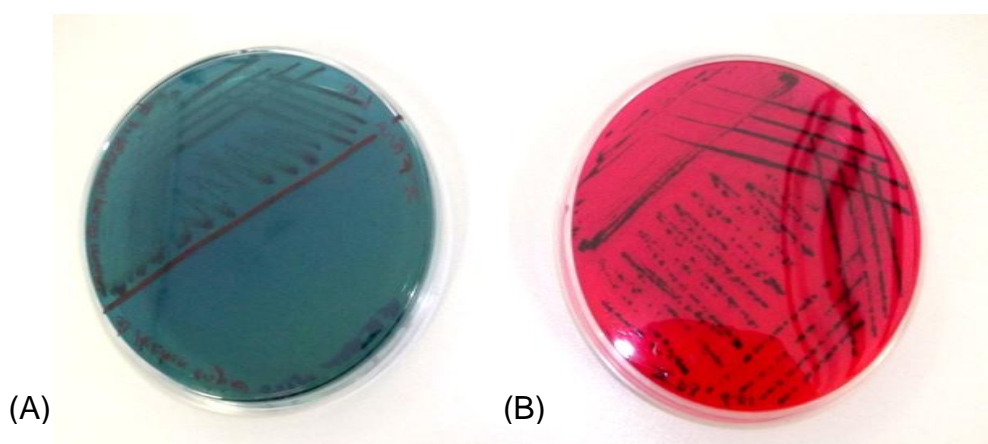
Após incubação foram semeadas três gotas equidistantes entre si, perfazendo um volume total de 100µl, em meio MSRVR (Biokar, Beauvais, França), um primeiro meio seletivo para verificação da existência de motilidade. Procedeu-se à incubação das placas a 41,5°C±1°C, sendo os positivos avaliados 48h±3h depois (Figura 5).

Figura 5 - Comparação entre placas de MSRV (48h±3h) com crescimento positivo para *Salmonella* spp (A) e negativo (B).



Com uma ansa de 1µl, colheu-se da zona limítrofe do halo de crescimento das placas consideradas positivas cultura para semear em agar Hektoen (Biokar, Beauvais, França) por esgotamento, outro meio seletivo, e incubadas a 37,5°C±1°C por 24h±3h. Em caso de dúvida, semeou-se ainda em meio “Xylose Lysine Deoxicholate” (XLD, Biokar, Beauvais, França), também seletivo, sendo incubadas a 37,5°C±1°C por 24h±3h (Figura 6).

Figura 6 - Morfologia de *Salmonella* spp em placas de Hektoen (A) e XLD (B) (24h±3h)



Das amostras suspeitas, procedeu-se à repicagem em agar “Triple Sugar Iron” (TSI, Biokar, Beauvais, França) em gelose inclinada e incubadas durante 24h±3h a 37°C±1°C. A aparência do agar e do crescimento bacteriano observado na rampa foram comparados com os resultados presentes na Tabela 1, e as amostras positivas para *Salmonella* spp continuaram o seu processamento para a serotipificação.

Tabela 1 - Morfologia de *Salmonella* spp e outros géneros em TSI Agar (Quin, Certer, Markey & Carter, 1994)

	Topo da gelose	Fundo da gelose	Produção de H <sub>2</sub> S
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Vermelha	Amarelo com gás	+
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	Vermelha	Amarelo com gás	-
<i>Proteus vulgaris</i>	Amarela	Amarelo com gás	-
<i>Proteus mirabilis</i>	Vermelha	Amarelo com gás	-
<i>Proteus morganii</i>	Vermelha	Amarelo com gás	-
<i>Proteus rettgeri</i>	Vermelha	Amarelo sem gás	-
<i>Escherichia coli</i>	Amarela	Amarelo com gás	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amarela	Vermelho/Amarelo com gás	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vermelha	Amarelo sem gás	-
<i>Shigella</i> spp.	Vermelha	Amarelo com gás	-
<i>Serratia marcescens</i>	Vermelha	Amarelo sem gás	-
<i>Enterobacter</i> spp.	Amarela	Amarelo com gás	-
<i>Hafnia alvei</i>	Vermelha	Amarelo com gás	-
<i>Citrobacter freundii</i>	Amarela	Amarelo com gás	+

#### 4.2.1. Serotipificação

Como preparação para a serotipificação, as amostras positivas para *Salmonella* spp foram semeadas repetidamente em Agar Nutriente (Scharlau, Barcelona, Espanha) e incubadas a 37°C±1°C durante 24h±3h para purificação da cultura.

A serotipificação das colónias suspeitas foi feita com base no Esquema de Kauffmann-White-Le Minor (Grimont & Weill, 2007) segundo o método de aglutinação, utilizando soros comerciais (Biorad, Madrid, Espanha) (Tabela 2). O princípio do teste consiste na ocorrência ou não de uma reação de aglutinação entre a bactéria suspeita e o soro – se a bactéria em causa apresenta os antigénios correspondentes, os anticorpos presentes no soro irão causar a aglutinação das bactérias, formando um precipitado granuloso indicativo de uma reação positiva; caso contrário, a suspensão bacteriana apresenta-se leitosa e homogénea, e portanto negativa.

Uma gota de soro polivalente Omni-O (soro anti-género *Salmonella*) foi colocada sobre uma lâmina de vidro ao qual se juntou, com uma ansa de 10µl, um pouco de cultura pura da amostra suspeita. Homogeneizou-se até obter uma suspensão leitosa e, após leve agitação durante uns segundos, observou-se a suspensão com recurso a iluminação direta para detetar a presença ou não do aglutinado. Se a reação foi considerada positiva, continuou-se com os soros O polivalentes (OMA, OMB), utilizando a mesma metodologia para posteriormente afunilar o espectro de antigénios somáticos testados com soros monovalentes.

Tabela 2 - Soros utilizados durante a serotipificação de *S. Typhimurium* monofásica

Soro	Antígeno(s) alvo
Omni-O	Mistura de vários antígenos somáticos
OMA	Grupos somáticos A, B, D, E, L
O:9	O:9
O:4,5	O:4,5
H:i	H:i
H:1,2	H:1,2
SG2	H:d, H:i, H:e,h

Após determinação do grupo somático, procedeu-se à determinação dos antígenos flagelares presentes seguindo um método semelhante; no entanto, como já foi referido, a presença das duas fases flagelares não é igual quantitativamente, ocorrendo a expressão mais acentuada de uma das fases flagelares, o que pode levar a uma interpretação errada de inexistência dessa fase devido a uma reação aparentemente negativa por falta de expressão. Assim, face a um resultado negativo de uma das fases, deve-se proceder ainda à 'inversão de fase', ou seja, ao bloqueio do flagelo conhecido através de seroaglutinação, de modo a obrigar a expressão da segunda fase flagelar e, assim, proceder à sua identificação. No LRAB a inversão de fase é efetuada através do método de Sven-Gard em placa, segundo as recomendações do fabricante, e foi aplicada em todos os isolados positivos aos soros Omni-O, OMA, O:4,5, H:i e negativos a O:9.

Resumidamente, 20 ml de agar Sven Gard (Biorad, Madrid, Espanha) foram aquecidos até aos 45°C. Após o arrefecimento, misturou-se no agar ainda líquido 1 gota de soro SG2, que contém anticorpos contra o flagelo *i*, e distribuiu-se por placas. Após solidificação do agar, inoculou-se no centro de cada placa uma colónia pura do isolado com uma ansa de 1µl e incubou-se na estufa a 37,5°C±1°C por 24h±3h. Em caso de se verificar uma migração, concluiu-se que houve expressão do segundo flagelo, o que permitiu testar o soro H:1,2 correspondente à segunda fase flagelar da *S. Typhimurium*.

#### 4.3. Susceptibilidade a antibióticos

A determinação da susceptibilidade aos antibióticos foi executada após o isolamento e identificação da amostra como *Salmonella* spp, utilizando-se dois métodos diferentes: difusão de disco e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição. Os dois procedimentos foram efetuados de acordo com os critérios estipulados pelo CLSI M31-A3 (CLSI, 2008). Os critérios de susceptibilidade considerados para cada antibiótico encontram-se listados no Anexo I.

#### **4.3.1. Teste de difusão de disco**

Após se efetuar a sementeira numa suspensão com o grau 0,5 da escala de McFarland em placas de Müller-Hinton Agar (Biokar, Beauvais, França) de colónias de cultura pura de *Salmonella* spp, foram aplicados os discos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) dos seguintes antibióticos: ácido nalidíxico 30µg, amoxicilina 10µg, amoxicilina-ácido clavulânico 20/10µg, cefotaxima 30µg, ceftazidima 30µg, ceftiofur 30µg, cefoxitina 30µg, sulfonamidas compostas 300µg e trimetoprim 5µg. Os discos foram posicionados de forma a permitir a ocorrência de sinergia ou antagonismo entre o disco de amoxicilina-ácido clavulânico com os discos de cefotaxima e ceftiofur, e cefoxitina, e assim detetar, respectivamente, a presença de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado ou cefalosporinases plasmídicas – teste do duplo disco. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $18\text{h} \pm 2\text{h}$ .

Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios presentes no M31-A3 (CLSI, 2008), tendo sido aplicados os critérios relativos à medicina humana – M100-S16 (CLSI, 2006) – no caso dos antibióticos não abrangidos pela norma veterinária (ácido nalidíxico, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e trimetoprim).

#### **4.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima**

Para a determinação da CIM de diferentes antibióticos foram utilizados painéis de microdiluição comerciais VetMIC Stördjur (National Veterinary Institute, Uppsala, Suécia) vocacionados para a testagem de princípios ativos utilizados em animais de produção, com diferentes concentrações de antibiótico desidratado colocado no fundo de poços de microtitulação. O procedimento foi efetuado segundo as recomendações do fabricante.

Os antibióticos testados consistiram em: ampicilina (1 - 8 µl), ceftiofur (0,25 - 2 µl), neomicina (4 - 32 µl), gentamicina (2 - 16 µl), estreptomicina (4 - 32 µl), sulfametoxazol/trimetoprim (9,5/0,5 - 76/4 µl), enrofloxacin (0,12 - 1 µl), oxitetraciclina (1 - 8 µl) e florfenicol (2 - 16 µl). Foi considerada como CIM a menor concentração em que não ocorreu crescimento visível.

Como base para a interpretação dos resultados utilizou-se o M31-A3 (CLSI, 2008), completando-se a informação referente aos critérios, nos casos dos antibióticos que não constavam do documento (estreptomicina e neomicina), com o constante das Recomendações 2010 para a medicina veterinária do Comité para o Antibiograma da Sociedade Francesa de Microbiologia (CA-SFM, 2010).

#### 4.4. Extração de ADN

O método utilizado para extrair ADN das amostras baseia-se no método de fervura apresentado em Malorny *et al* (2003). Resumidamente, semeou-se uma colónia pura em 2 ml de meio líquido Luria-Bertani (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos da América) e incubou-se durante 24h±3h a 37°C±1°C. Seguidamente, transferiu-se 1 ml de cultura para um tubo de centrífuga de 1,5ml e centrifugou-se durante 5 minutos a 13 200 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em Tris-EDTA 10:1, submetendo-se a um processo de fervura durante 10 minutos. Após a fervura, refrigeraram-se as amostras durante 30 segundos e levou-se a nova centrifugação, nos mesmos parâmetros da anterior. Por fim, retirou-se o ADN em suspensão para um novo tubo de centrífuga, descartando-se o sedimento.

#### 4.5. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Para a confirmação da identificação dos isolados como *Salmonella* spp e serovares Typhimurium e variante monofásica, e detecção de genes de resistência associados com os antibióticos em estudo potencialmente presentes, foi utilizada a técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction"), com adaptação e implementação de vários protocolos conforme as condições necessárias para cada reação. O aparelho usado em todos os protocolos foi o termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). A Tabela 3 detalha os oligonucleótidos utilizados neste trabalho.

Tabela 3 - Sequências, tamanho (pares de bases) e referência dos oligonucleótidos utilizados

Gene/Região	Sequência	Tamanho (pb)	Referência
<b>invA</b>	<i>invAf</i> - 5' GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA 3' <i>invAr</i> - 5' TCATCGCACCGTCAAAGGAACC 3'	284	Malorny <i>et al</i> , 2003
<b>Região Intergénica <i>fliB-fliA</i></b>	<i>FFLIB</i> - 5' CTGGCGACGATCTGTCGATG 3' <i>RFLIA</i> - 5' GCGGTATACAGTGAATTCAC 3'	1000/250	Echeita <i>et al</i> , 2001
<b><i>fljB</i></b>	<i>Sense</i> 59 - 5' CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG 3' <i>Antisense</i> 83 - 5' GCCATATTTACAGCCTCTCGCCCG 3'	1389	Vanegas & Joys, 1995
<b><i>tet(A)</i></b>	<i>tetAf</i> - 5' GTAATTCTGAGCACTGTCGC 3' <i>tetAr</i> - 5' CTGCCTGGACAACATTGCTT 3'	937	Guardabassi <i>et al</i> , 2000
<b><i>tet(B)</i></b>	<i>tetBf</i> - 5' CTCAGTATTCCAAGCCTTTG 3' <i>tetBr</i> - 5' CTAAGCACTTGTCTCCTGTT 3'	416	Guardabassi <i>et al</i> , 2000
<b><i>aadA</i></b>	<i>aadAf</i> - 5' GCAGCGCAATGACATTCTTG 3' <i>aadAr</i> - 5' ATCCTTCGGCGCGATTTTG 3'	282	Hollingshead & Vapnek, 1985
<b><i>aac(3)-IV</i></b>	<i>aacC4f</i> - 5' CTTCAAGGATGGCAAGTTGGT 3' <i>aacC4r</i> - 5' TCATCTCGTTCTCCGCTCAT 3'	416	Sáenz <i>et al</i> , 2004



Tabela 3 (cont.) - Sequências, tamanho (pares de bases) e referência dos oligonucleótidos utilizados

<b>aac(6)-Ib</b>	<i>aaC6lbf1</i> - 5' ATATGCGGATCCAATGAGCAACGCAAAAACAAAGTTAG 3' <i>aaC6lbr1</i> - 5' ATATGCGAATTCTTAGGCATCACTGCGTGTTTCGCTC 3'	624	Robicsek <i>et al</i> , 2006
<b>floR</b>	<i>floR1</i> - 5' CACGTTGAGCCTCTATAT 3' <i>floR2</i> - 5' ATGCAGAAGTAGAACGCG 3'	868	del Cerro <i>et al</i> , 2003
<b>sul1</b>	<i>sul1f</i> - 5' TGGTGACGGTGTTTCGGCATTTC 3' <i>sul1r</i> - 5' GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG 3'	769	Mazel <i>et al</i> , 2000
<b>sul2</b>	<i>sul2f</i> - 5' CGGCATCGTCAACATAAC 3' <i>sul2r</i> - 5' GTGTGCGGATGAAGTCAG 3'	722	Maynard <i>et al</i> , 2003
<b>dfrIa</b>	<i>dfrIaf</i> - 5' GTGAACTATCACTAATGG 3' <i>dfrIar</i> - 5' TTAACCCTTTTGCCAGATTT 3'	474	Navia <i>et al</i> , 2003
<b>bla<sub>TEM</sub></b>	<i>P1</i> - 5' TACGATACGGGAGGGCTTAC 3' <i>P2</i> - 5' TTCCTGTTTTTGCTCACCCA 3'	716	Pomba <i>et al</i> , 2006
<b>bla<sub>SHV</sub></b>	<i>shvf1</i> - 5' TCAGCGAAAAACACCTTG 3' <i>shvr</i> - 5' TCCCGCAGATAAATCACCA 3'	471	Pomba <i>et al</i> , 2006
<b>bla<sub>OXA-1</sub></b>	<i>oxa1f</i> - 5' TATCTACAGCAGCGCCAGTG 3' <i>oxa1r</i> - 5' CGCATCAAATGCCATAAGTG 3'	199	Pomba <i>et al</i> , 2006
<b>bla<sub>CTX-M</sub></b>	<i>CTXf</i> - 5' TTTGCGATGTGCCAGTACCAGTAA 3' <i>CTXr</i> - 5' CGATATCGTTGGTGGTGCCATA 3'	544	Edelstein <i>et al</i> , 2003
<b>qnrA</b>	<i>qnrFMVF</i> 225 - 5' CGTCTGTCTTTGGCCAACTT 3' <i>qnrFMVR</i> - 5' TGACTTCAGCCACTGTCAGC 3'	225	Pomba <i>et al</i> , 2009
<b>qnrB</b>	<i>qnrBFQ1</i> - 5' ATGACGCCATTACTGTATAA 3' <i>qnrBFQ2</i> - 5' GATCGCAATGTGTGAAGTTT 3'	562	Jacoby <i>et al</i> , 2006
<b>qnrS</b>	<i>qnrSf</i> - 5' ACGACATTCGTCAACTGCAA 3' <i>qnrSr</i> - 5' TAAATTGGCACCCCTGTAGGC 3'	417	Gay <i>et al</i> , 2006

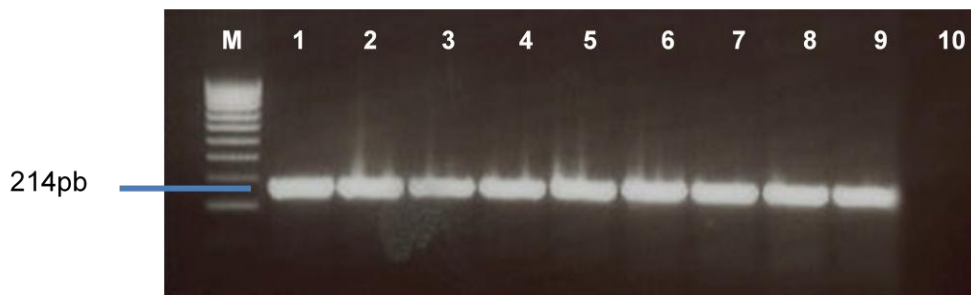
Após todos os PCR, os produtos foram submetidos a eletroforese com tris-borato-EDTA (TBE) 0.5x ou tris-acetato-EDTA (TAE) 1x em agarose (NZYTech, Lisboa, Portugal) com uma concentração de acordo com o peso molecular do produto em questão, corados com brometo de etídeo e visualizados através de transiluminação por UV (Thermal Imaging System FTI-500, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA). Em simultâneo com os produtos de PCR utilizou-se também um marcador de peso molecular consoante a sua dimensão: até 1000pb, NZYDNA Ladder V, 100-1000pb (NZYTech, Lisboa, Portugal); 1000pb e superior, NZYDNA Ladder III, 100-10.000pb (NZYTech, Lisboa, Portugal).

#### 4.5.1. Confirmação de género

A identificação dos isolados como *Salmonella* spp foi confirmada através de PCR com um protocolo adaptado de Malorny *et al* (2003) (Figura 7). Resumidamente, foi efetuada uma mistura para cada amostra com 25 µl de volume final de reação composta por 2 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *invAf* (10 pmol) e *invAr* (10 pmol) 0,2 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de

MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 de desoxirribonucleótido trifosfatos (dNTP) (25 mM) e 14,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

Figura 7 - Exemplo de eletroforese em agarose de produtos de PCR para detecção de *invA*



Linha M – marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V, 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200 e 100pb; Linha 1 – controlo positivo *S. Typhimurium*, gene *invA* 284pb; Linhas 2 a 9 – estirpes de *S. 4,[5],12:i:-* isoladas de Porca FMV A, Leitão FMV A1, Leitão FMV A2, Leitão FMV A3, Leitão FMV A4, Leitão FMV A5, Leitão FMV A6 e Leitão FMV A7, positivas para *invA*; Linha 10 – controlo negativo sem ADN.

#### 4.5.2. Confirmação de serovar *Typhimurium* e diferenciação da variante monofásica

Através da utilização de uma adaptação do PCR multiplex recomendado pela EFSA (BIOHAZ, 2010), procedeu-se à confirmação das amostras pertencentes ao grupo O:4,5 como *Typhimurium* ou como a variante monofásica O:1,4,[5],12:i:-. A região intergénica *fliB-fliA* e o gene *fljB* foram testados em separado. Ambas as misturas foram efetuadas para um volume final de reacção de 50 µl. Para a detecção da região intergénica *fliB-fliA*, compôs-se a mistura com 3 µl de ADN da amostra, 2 µl dos oligonucleótidos *FFLIB* (10 pmol) e *RFLIA* (10 pmol), 0,4 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 10 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 7 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,4 µl de dNTP (25 mM) e 25,2 µl de água MilliQ. A mistura para a detecção de *fljB* é semelhante, sendo utilizados como oligonucleótidos 1 µl de *Sense* 59 (10 pmol) e 1 µl de *Antisense* 83, com o ajuste da quantidade de água necessária para acertar o volume final.

Um programa de amplificação diferente foi usado consoante o par de oligonucleótidos utilizado. O programa de amplificação da região intergénica *fliB-fliA* consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 55°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C. O programa de amplificação de *fljB* consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 95°C durante 2 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridação a

64°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 90 segundos; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

#### **4.5.3. Detecção de genes de resistência a tetraciclinas – *tet(A)* e *tet(B)***

Para a detecção dos genes de resistência *tet(A)* e *tet(B)* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação para ambos os genes, composto por 1 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *tetAf* (10 pmol) e *tetAr* (10 pmol), ou *tetBf* (10 pmol) e *tetBr* (10 pmol) conforme o gene em estudo, 0,2 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 de dNTP (25 mM) e 13,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 57°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

#### **4.5.4. Detecção de genes de resistência a aminoglicosídeos**

##### **4.5.4.1. Estreptomicina - *aadA***

Para a detecção do gene de resistência *aadA* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação, composto por 1 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *aadAf* (10 pmol) e *aadAr* (10 pmol), 0,2 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 de dNTP (25 mM) e 14,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 57°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

##### **4.5.4.2. Gentamicina – *aac(3)-IV***

Para a detecção do gene de resistência *aac(3)-IV* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 50 µl por reação, composto por 2 µl de ADN da amostra, 2 µl dos oligonucleótidos *aaC4f* (10 pmol) e *aaC4r* (10 pmol), 0,4 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 10 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,4 de dNTP (25 mM) e 30,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 55°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

##### **4.5.4.3. Gentamicina – *aac(6)-Ib***

Para a detecção do gene de resistência *aac(6)-Ib* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação, composto por 3 µl de ADN da amostra, 1 µl dos

oligonucleótidos *aaC6lbf1* (10 pmol) e *aaC6lbr1* (10 pmol), 12,5 µl de Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal) e 7,5 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 61°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 7 minutos a 72°C.

#### **4.5.5. Detecção de genes de resistência ao florfenicol - *floR***

Para a deteção do gene de resistência *floR* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação, composto por 1 µl de ADN da amostra, 2,5 µl dos oligonucleótidos *floR1* (10 pmol) e *floR2* (10 pmol), 0,2 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 de dNTP (25 mM) e 12,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 57°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

#### **4.5.6. Detecção de genes de resistência a sulfamidas**

##### **4.5.6.1. *sul1***

Para a deteção do gene de resistência *sul1* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação, composto por 1 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *sul1f* (10 pmol) e *sul1r* (10 pmol), 0,2 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 de dNTP (25 mM) e 15,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos; hibridação inicial a 61°C durante 5 minutos; 30 ciclos completos de extensão a 72°C durante 1 minuto, desnaturação a 94°C durante 1 minuto e hibridação a 61°C durante 2 minutos; e um ciclo final de extensão durante 5 minutos a 72°C.

##### **4.5.6.2. *sul2***

Para a deteção do gene de resistência *sul2* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação, composto por 1 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *sul2f* (10 pmol) e *sul2r* (10 pmol), 0,2 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 de dNTP (25 mM) e 15,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 50°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

#### 4.5.7. Detecção de genes de resistência ao trimetoprim – *dfrA1*

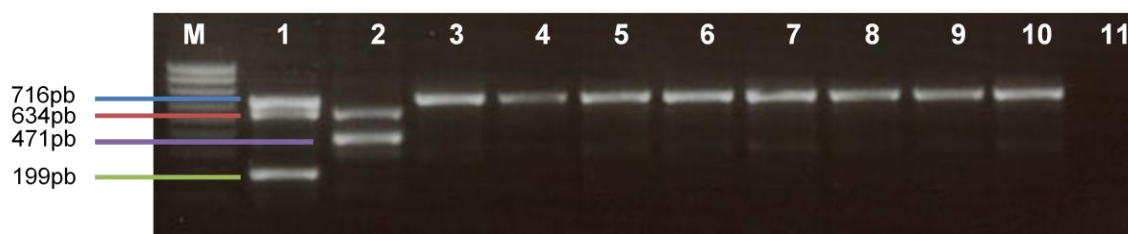
Para a detecção do grupo de genes de resistência *dfrA1* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação, composto por 1 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *dfrlaf* (10 pmol) e *dfrlar* (10 pmol), 0,2 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,2 de dNTP (25 mM) e 14,1 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 35 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 55°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

#### 4.5.8. Detecção de genes de resistência a beta-lactâmicos

##### 4.5.8.1. Beta-lactamases TEM, OXA e SHV

Para a detecção dos genes de resistência *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub> utilizou-se o protocolo de multiplex PCR segundo Pomba *et al* (2006) (Figura 8) com um volume final de 50 µl por reação, composto por 2 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *P1* (10 pmol), *P2* (10 pmol), *oxa1f* (10 pmol) e *oxa1r* (10 pmol), e 3 µl dos oligonucleótidos *shvf1* (10 pmol) e *shvr* (10 pmol), 0,3 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 10 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 de dNTP (25 mM), 0,26 µl de DMSO a 5%, e 23,94 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos; hibridação inicial a 61°C durante 5 minutos; 30 ciclos completos de extensão a 72°C durante 1 minuto, desnaturação a 94°C durante 1 minuto e hibridação a 61°C durante 2 minutos; e um ciclo final de extensão durante 5 minutos a 72°C.

Figura 8 - Exemplo de eletroforese em agarose dos produtos do multiplex PCR de detecção de *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-1</sub>



Linha M – marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder V, 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200 e 100pb; Linha 1 – controlo positivo *E. coli*, estirpe 5825/04 (Pomba *et al*, 2006), genes *bla*<sub>TEM</sub> 716pb, *ampC* cromossómico constitutivo 634pb e *bla*<sub>OXA-1</sub> 199pb; Linha 2 – controlo positivo *E. coli*, estirpe transconjugante K12 gentilmente cedida pelo Dr. Jorge Machado do Instituto Nacional de Saúde Dr.

Ricardo Jorge, genes *ampC* cromossómico constitutivo 634pb e *bla*<sub>SHV-5</sub> 471pb; Linha 3 a 10 – estirpes de *S. 4,[5],12:i:-* isoladas de Porca FMV A, Leitão FMV A1, Leitão FMV A2, Leitão FMV A3, Leitão FMV A4, Leitão FMV A5, Leitão FMV A6 e Leitão FMV A7 positivas a *bla*<sub>TEM</sub>; Linha 11 – controlo negativo sem ADN.

#### **4.5.8.2. Beta-lactamase CTX-M**

Para a detecção do gene de resistência *bla*<sub>CTX-M</sub> utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 50 µl por reação, composto por 2 µl de ADN da amostra, 1,25 µl dos oligonucleótidos *CTXf* (20 pmol) e *CTXr* (20 pmol), 25 µl de Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal) e 20,5 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 7 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 57°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

#### **4.5.9. Detecção de genes de resistência a quinolonas e fluoroquinolonas**

##### **4.5.9.1. *qnrA* e *qnrS***

Para a detecção dos genes de resistência *qnrA* e *qnrS* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação para ambos os genes, composto por 3 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *qnrFMVF* 225 (10 pmol) e *qnrFMVR* (10 pmol), ou *qnrSf* (10 pmol) e *qnrSr* (10 pmol) conforme o gene em estudo, 12,5 µl de Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix (NZYTech, Lisboa, Portugal) e 7,5 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

##### **4.5.9.2. *qnrB***

Para a detecção do gene de resistência *qnrB* utilizou-se um protocolo de PCR com um volume final de 25 µl por reação, composto por 2,5 µl de ADN da amostra, 1 µl dos oligonucleótidos *qnrBFQ1* (10 pmol) e *qnrBFQ2* (10 pmol), 0,25 µl de Taq NZYTech (NZYTech, Lisboa, Portugal), 5 µl de tampão correspondente sem MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,6 de dNTP (25 mM), 0.13 µl de DMSO a 5% e 12,02 µl de água MilliQ. O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos completos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto; e um ciclo final de extensão durante 10 minutos a 72°C.

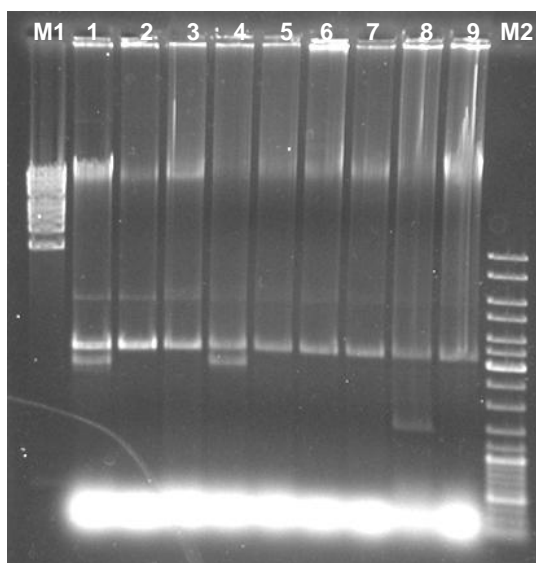
#### **4.6. Extração e linearização de plasmídeos**

A extração de ADN plasmídico foi efetuada segundo o método de lise alcalina, adaptado de Kehrenberger, Friederics, de Jong, Michael e Schwarz (2006). Este método consiste na utilização de um tampão alcalino para desnaturar o ADN cromossómico e manter o ADN plasmídico inalterado, para que após a neutralização o ADN cromossómico seja depositado

como um sedimento insolúvel enquanto o ADN plasmídico se mantém no sobrenadante (Birnboim & Dolly, 1979). A concentração de ADN presente após a extração foi quantificada por espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA).

O ADN plasmídico extraído foi em seguida submetido a eletroforese com TAE 1x em 0,8% de agarose (NZYTech, Lisboa, Portugal) a 4 V/cm durante 40 minutos, aumentando depois para 8 V/cm durante 2 horas. Foram utilizados dois marcadores de peso molecular, um em cada extremo do gel - GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10000pb e GeneRuler High Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA). Após a eletroforese, a agarose foi corada com brometo de etídeo e visualizada através de transiluminação por UV (Figura 9).

Figura 9 - Exemplo de eletroforese em agarose de plasmídeos não digeridos



Linha M1 – marcador de pesos moleculares n48502, 24508, 20555, 17000, 15258, 13825, 12119 e 10171pb; Linha 1 a 9 – estirpes S. 4,[5],12:i:- isoladas de Porca FMV B, Leitão FMV B2, Leitão FMV B5, Leitão FMV B7, Porca FMV D, Leitão FMV D2, Leitão FMV D3, Leitão FMV D4 e Leitão FMV D5; Linha M2 – marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10000pb, 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100pb.

A visualização da agarose após a eletroforese de plasmídeos revela a existência de diferentes bandas, dependendo da concentração de ADN da amostra. Estas bandas consistem em formas do plasmídeo simultaneamente presentes na amostra com diferentes capacidades de migrar através da agarose (Schmidt, Friehs, Schleef, Voss & Flaschel, 1999). As formas normalmente observadas consistem na forma superenrolada, em que o plasmídeo se encontra fechado enrolado sobre si próprio e consistindo na sua forma mais estável, e na forma covalentemente ligada, circular, sendo possível o aparecimento de outras bandas caso a concentração da amostra seja elevada e ocorra degradação ou fragmentação do plasmídeo. A correspondência entre as diferentes bandas e as formas que possam estar presentes não é fácil, pois pode variar conforme as condições da eletroforese

(Schmidt *et al*, 1999). Além disso, os marcadores de peso molecular geralmente usados são construídos com ADN linear, pelo que a determinação do peso molecular do plasmídeo por comparação com estes marcadores será mais fiel à realidade quando o plasmídeo se encontra igualmente numa forma linear; no entanto, é raramente possível visualizar o plasmídeo linearizado sem se recorrer à utilização de enzimas de restrição (Barton, Harding & Zuccarelli, 1995)

Para uniformizar os plasmídeos extraídos e tornar possível uma comparação fidedigna com os marcadores de peso molecular usados, utilizou-se como base um protocolo de PFGE com utilização da exonuclease S1 (Barton *et al*, 1995) na construção de um método que permitisse obter apenas formas lineares de plasmídeos e que pudesse ser submetido a eletroforese normal em vez de PFGE. Após extração, adicionou-se a 10 µl de ADN plasmídico 17,9 µl de água MilliQ, 0,1 µl de exonuclease S1 e 2 µl de tampão próprio (Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA), terminando com um volume total de 30 µl. Após 90 minutos a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria, o ADN digerido foi submetido a eletroforese, utilizando como controlo da restrição o ADN plasmídico não digerido e um plasmídeo previamente caracterizado de peso molecular conhecido – pUC19 de ~2800pb. Tendo em conta que os plasmídeos observados após extração aparentavam ser de dimensões inferiores a 10000pb, optou-se por um marcador de peso molecular de 100 a 10000pb (GeneRuler ADN Ladder Mix 100-10000pb, Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA). Depois da eletroforese, a agarose foi corada com brometo de etídeo e visualizada no transiluminador de UV com uma régua transparente ao lado como escala.

Para determinar a dimensão das formas lineares dos plasmídeos obtidos, recorreu-se à regressão logarítmica (Excel 2007 para Windows), construindo uma reta com as distâncias percorridas pelas diferentes bandas do marcador e calculando a partir da fórmula o peso dos plasmídeos em causa.

#### **4.7. Clonalidade – PFGE**

O protocolo de PFGE utilizado foi adaptado de Hunter *et al* (2005), com algumas modificações. Resumidamente, os isolados de *Salmonella* foram incubados em placas de agar-sangue durante a noite e incorporados em “plugs” com 1% de agarose (SeaKem GTG Agarose, Cambrex, Rockland, EUA). A lise das células foi efectuada pela proteinase K (Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA) com um período de incubação a  $54^{\circ}\text{C}$  de 2 horas. Utilizou-se a enzima XbaI (Thermo Fisher Scientific, Wyman, EUA) para restrição, com um tempo de contacto de 3 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 50 U/ 200µl por reacção. A eletroforese foi efectuada num sistema CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, San Diego, EUA), com um bloco com “switch time” de 1s-15s durante 7 horas a 6 V/cm e outro bloco de 15s-35s durante 13 horas a 6 V/cm. Como marcador de referência utilizou-se a estirpe H9812 de *Salmonella* Braenderup recomendada por Hunter *et al*. (2005).



Os perfis obtidos após coloração do gel com brometo de etídeo foram processados no programa BioNumerics (Applied Math, Ghent, Bélgica) e analisados segundo o método de agrupamento pelas médias aritméticas não ponderadas (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”, UPGMA), utilizando o coeficiente de semelhança de Dice. A definição de grupo clonal e subgrupo clonal foi efetuada de acordo com os critérios de Carriço *et al* (2005), considerando-se do mesmo grupo clonal isolados semelhantes em pelo menos 80%, com tolerância de posição das bandas de 1,7%, e do mesmo subgrupo clonal quando semelhantes em pelo menos 97%, com tolerância de 2,5%.

#### **4.8. Análise estatística**

A relação entre a presença ou não da variante monofásica de *S. Typhimurium* nas mães e nos leitões foi avaliada através do Teste Exato de Fisher com o programa R (<http://www.r-project.org>). Para as diferenças serem consideradas significativas, o valor de p obtido tem de ser igual ou inferior a 0,05.

## 5. Resultados

Vinte e quatro dos isolados obtidos a partir das amostras dos oitenta animais em estudo foram positivos para *Salmonella*, tendo sido obtido apenas um isolado por amostra. Todos foram serotipificados exceto um, proveniente de uma porca cuja serotipificação não foi possível completar durante o estágio, mas definitivamente pertencente a um serogrupo que não o O:4,5. Os restantes isolados (n=23) foram identificados como S. 4,[5],12:i:-, com o resultado da inversão de fase para expressão do antígeno 1,2 negativo e confirmação por PCR. Destes 23 isolados, seis foram provenientes de porcas (60%) e dezassete de leitões (24.2%), tendo sido identificadas três famílias (porca e pelo menos um leitão respetivo) – A, B e D – como portadoras (Figura 10), três porcas sem leitões positivos e um leitão positivo com o resto da família negativa. Os isolados pertencentes às famílias A, B e D (n=19) continuaram a ser estudados e os resultados obtidos foram sumarizados na Tabela 4, os restantes foram utilizados para a análise estatística descrita na página 39, Tabela 5.

Figura 10 - Famílias portadoras de S. 4,[5],12:i:-.

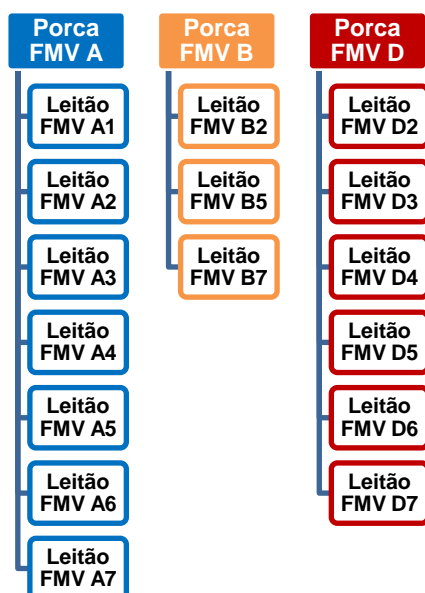


Tabela 4 - Padrão fenotípico e genotípico de resistência a antibióticos, plasmídeos e subgrupos clonais das famílias A, B e D

Isolado	Padrão de resistência	Genes de resistência	Subgrupo clonal	Plasmídeos
<b>Porca FMV A</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A1	5600 pb
<b>Leitão FMV A1</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV A2</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A5	5600 pb
<b>Leitão FMV A3</b>	AML,AMC, N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV A4</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B)</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV A5</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV A6</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A2	5600 pb
<b>Leitão FMV A7</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A3	5600 pb
<b>Porca FMV B</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV B2</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV B5</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV B7</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Porca FMV D</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A2	5600 pb
<b>Leitão FMV D2</b>	AML,AMC, N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV D3</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A1	5600 pb
<b>Leitão FMV D4</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV D5</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A	5600 pb
<b>Leitão FMV D6</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A6	5600 pb
<b>Leitão FMV D7</b>	AML,N,NA,S3,STR,TE	<i>bla<sub>TEM</sub>,tet(B),sul2</i>	A4	5600 pb

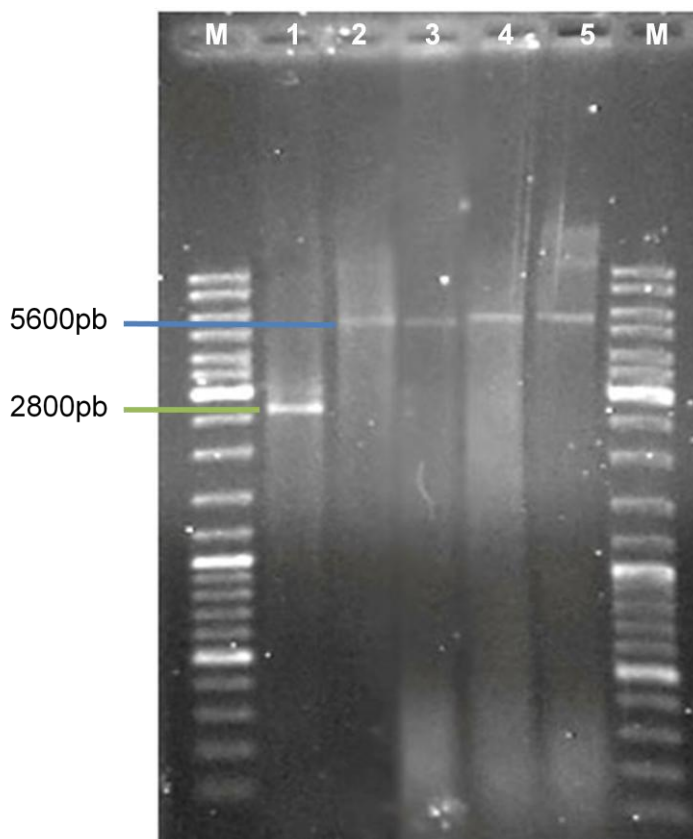
AML- amoxicilina, AMC- amoxicilina/ácido clavulânico, N- neomicina, NA- ácido nalidíxico, S3- sulfonamidas compostas, STR- estreptomicina, TE- tetraciclina

Dois padrões diferentes de resistência a antibióticos foram detetados, ambos de multirresistência. Dezassete dos isolados apresentaram um padrão de resistência a ácido nalidíxico, amoxicilina, estreptomicina, neomicina, sulfamidas compostas e tetraciclina, e nos

restantes 2 verificou-se uma resistência adicional a amoxicilina-ácido clavulânico (Anexo II). Relativamente aos genes de resistência testados, todos os isolados foram positivos aos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *sul2* e *tet*(B) exceto um, negativo a *sul2*.

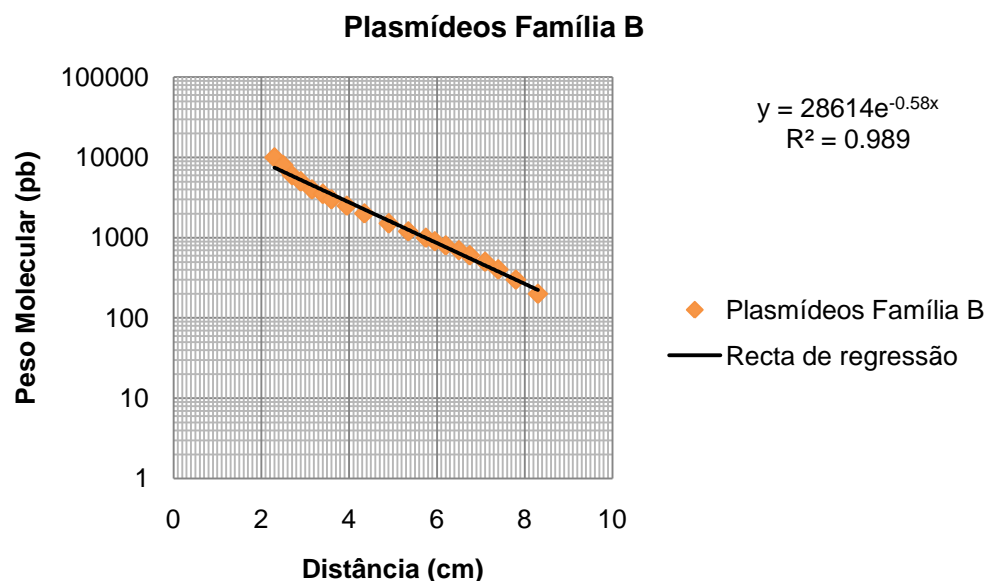
Foi possível extrair e linearizar plasmídeos de todos os isolados. Em todas as amostras observou-se um plasmídeo de pequena dimensão, aproximadamente com 5600pb (Figura 11) segundo a reta de regressão (Figura 12).

Figura 11 - Eletroforese em agarose de plasmídeos linearizados da família B.



Linhas M – marcador de pesos moleculares GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10000pb, 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100pb; Linha 1 – ADN do plasmídeo pUC 19 linearizado após digestão com exonuclease S1, 2800pb; Linha 2 a 5- ADN de plasmídeos extraídos de estirpes *S. 4*, [5], 12:i:- isolados de Porca FMV B, Leitão FMV B2, Leitão FMV B5 e Leitão FMV B7 linearizados após digestão com exonuclease S1, 5600pb.

Figura 12 - Regressão linear para cálculo do peso dos plasmídeos da família B.



O estudo de clonalidade por PFGE revelou que todos os isolados pertencentes às famílias são relacionados entre si, tendo sido classificados como fazendo parte do mesmo grupo clonal ( $\geq 80\%$  semelhança, 1,7% tolerância entre bandas) (Figura 13).

Onze dos padrões obtidos (n=19) revelaram um perfil comum (A), com  $\geq 97\%$  semelhança e 2,5% tolerância entre bandas (Figura 14). Constituindo o perfil associado à maioria dos isolados, o perfil A engloba uma família inteira, a família B, 4 leitões pertencentes à família A e 2 leitões pertencentes à família D, apresentando 100% de semelhança entre os diferentes isolados, e um leitão da família D com 97,1% de semelhança. Os restantes padrões foram distribuídos por 6 subgrupos clonais – A1 (n=2), A2 (n=2), A3 (n=1), A4 (n=1), A5 (n=1) e A6 (n=1) – constituídos pelos restantes membros das famílias A e D.

Figura 13 - Dendrograma de identificação de grupo clonal – coeficiente de tolerância 1,7%

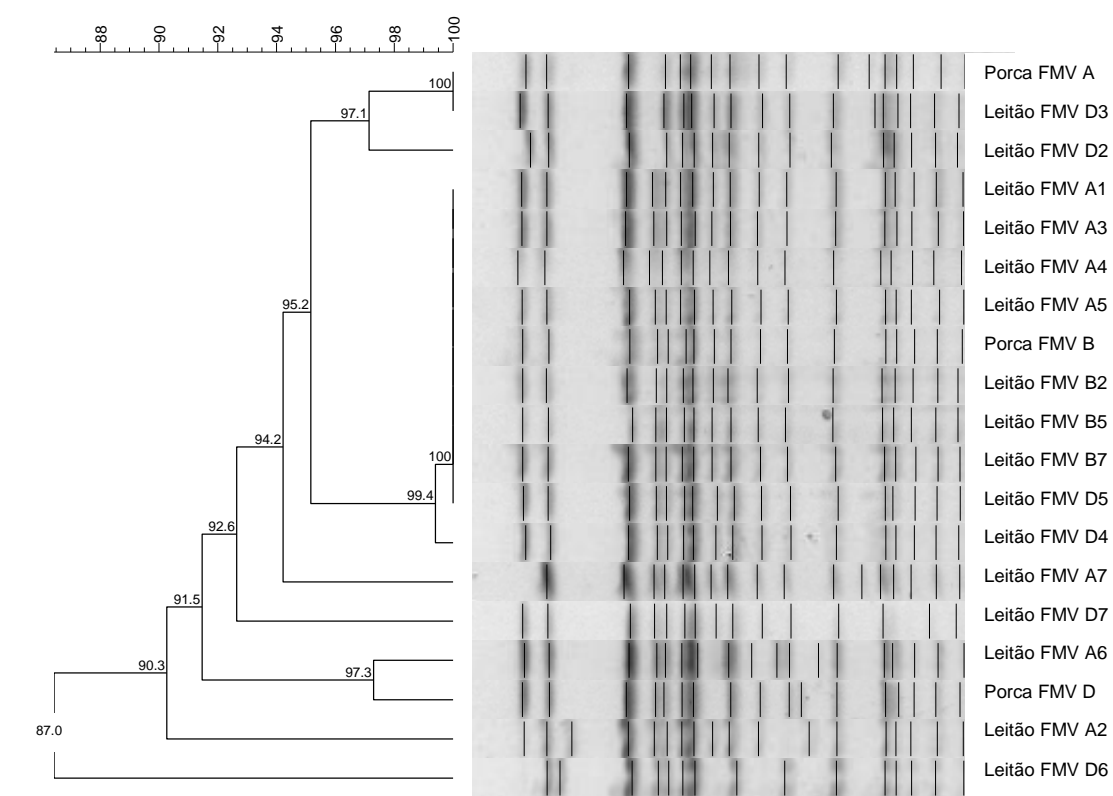
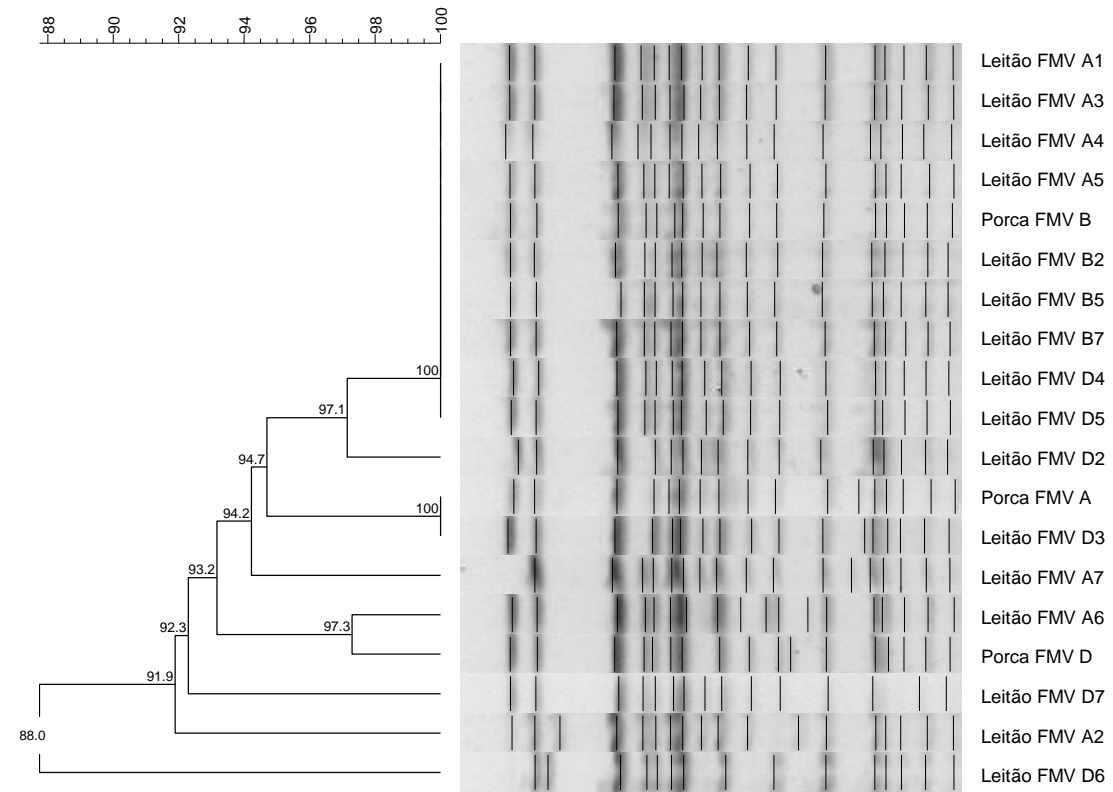


Figura 14 - Dendrograma de identificação de subgrupo clonal – coeficiente de tolerância 2,5%



Para a análise estatística, propôs-se a seguinte hipótese nula: uma porca portadora de S. 4,[5],12:i:- não é um fator de risco para os leitões descendentes serem portadores de S.4,[5],12:i:-. A tabela de contingência é apresentada em seguida (Tabela 4).

Tabela 5 - Quantificação de leitões positivos e negativos a S. 4,[5],12:i:- relativamente à positividade da porca progenitora

	Leitões positivos a S. 4,[5],12:i:-	Leitões negativos a S. 4,[5],12:i:-	Total
Porcas positivas a S. 4,[5],12:i:-	16	26	42
Porcas negativas a S. 4,[5],12:i:-	1	27	28
Total	17	53	70

Segundo o Teste Exacto de Fisher, a probabilidade de uma porca portadora de S. 4,[5],12:i:- ter descendência positiva com o mesmo serovar é altamente significativa ( $p=0,001$ ,  $OR=16,10209$ ), rejeitando a hipótese nula, e um leitão positivo tem uma probabilidade 16 vezes superior de ser filho de uma mãe positiva que o de uma mãe negativa.

## 6. Discussão

Vários investigadores têm reportado uma prevalência relativamente alta de infeções subclínicas por *Salmonella* em porcas reprodutoras (Funk, Davies & Nichols, 2001; Nollet *et al*, 2005). Para além de atuarem como vetores de contaminação ambiental, potenciando a manutenção de *Salmonella* no ambiente, e de constituírem um risco para a segurança alimentar após abate, pouca informação existe sobre a influência das porcas portadoras nos seus descendentes (Funk & Gebreyes, 2004). Um estudo (Kranker, Alban, Boes & Dahl, 2003) sugere que o papel das porcas portadoras possa ser pouco relevante na transmissão aos leitões e, noutro estudo (Funk *et al*, 2001), os leitões eram portadores de serovares diferentes dos das porcas, o que é contraditório relativamente aos resultados apresentados neste trabalho. No entanto, um estudo na Dinamarca sugere que porcos descendentes de porcas pertencentes a grupos com elevada prevalência estão em maior risco de isolamento de *Salmonella* do mesmo serovar que a mãe (Funk & Gebreyes, 2004), e Belœil *et al* (2004) constituíram a porca portadora como um factor de risco para os seus descendentes. Estes dois últimos estudos estão em concordância com os resultados obtidos, já que a análise estatística revelou que o risco de o leitão ser positivo a *Salmonella* é marcadamente superior no caso de ser descendente duma porca portadora, e a probabilidade de uma porca positiva ter descendentes positivos ao mesmo serovar é altamente significativa, constituindo um factor de risco.

Para além de demonstrar a existência duma relação entre a *Salmonella* presente na porca e nos seus descendentes, neste trabalho recorreu-se à utilização de vários métodos fenotípicos e genotípicos como suporte da hipótese de que existe transmissão mãe-filho durante ou imediatamente após o parto como meio de colonização do intestino do neonato, tendo por base a semelhança entre as diferentes características estudadas - padrão de resistência, genes de resistência aos antibióticos, perfil plasmídico e padrões de PFGE. Todos os isolados pertencentes às famílias apresentam de facto características muito semelhantes, não só dentro da própria família como também entre si, demonstrando uma relação próxima entre todos os isolados até ao nível clonal, dado que todas as estirpes apresentaram mais de 85% de semelhança, com algumas variações quanto ao subgrupo clonal. De notar que uma das famílias, a família B, apresenta 100% de semelhança dos seus isolados, suportando uma forte relação entre o isolado da mãe e dos leitões. Esta relação aponta para a existência de transmissão mãe-descendente em suínos deste serovar. Apesar de a preponderância desta via de transmissão ser desconhecida e de necessitar estudos mais aprofundados para a averiguar, o reconhecimento da existência de uma via que era previamente desconhecida e o seu estudo permitirá não só um aprofundamento do conhecimento sobre *Salmonella* como também o surgimento de novas formas de limitar (e potencialmente ajudar a eliminar) a disseminação desta bactéria por animais, ambiente e humanos. A demonstração da transmissão mãe-descendente mostra ainda a importância da implementação de boas práticas de higiene e biossegurança a este nível da produção suinícola para travar a disseminação e manutenção no ecossistema de *Salmonella*, o que toma especial importância quando o serovar em circulação é multirresistente. A transmissão de estirpes multirresistentes entre mãe e filhos é particularmente preocupante – todos os animais em estudo não manifestaram qualquer sinal de doença, apresentando-se completamente assintomáticos, e quando a infeção não gera qualquer tipo de sinal é pouco provável que a presença da bactéria seja averiguada sem nenhum tipo de programa de vigilância em prática. A realização de rastreio de *Salmonella* com base em serologia nas porcas reprodutoras e a utilização exclusiva do efetivo seronegativo com segregação dos animais seropositivos poderá ser uma medida com impacto positivo na redução da transmissão de *Salmonella* da porca para os seus descendentes. A vacinação das porcas gestantes e dos leitões poderá constituir uma alternativa, diminuindo o risco de colonização por *Salmonella* e promovendo um maior grau de imunização dos leitões. A transmissão mãe-descendente assintomática potencia a contaminação, não só ao longo da cadeia de produção, como também dos produtos obtidos a partir dos animais portadores, pelo que o estudo do risco associado a esta via de transmissão e a presença de *Salmonella* nos produtos alimentares, nomeadamente de estirpes multirresistentes, poderá ser recomendado.



Existem a nível europeu duas variantes diferentes de *S. Typhimurium* monofásica caracterizadas por apresentarem padrões de resistência e genes de resistência a antibióticos fundamentalmente diferentes. O padrão de resistência dos isolados identificados neste estudo é semelhante ao reportado a nível europeu, com a adição das resistências ao ácido nalidíxico e à neomicina ao padrão de base europeu, o que indica que este grupo clonal possa ser relacionado com o europeu. Os genes identificados por PCR suportam esta teoria, com a resistência a ampicilina (codificada por *bla*<sub>TEM</sub>), tetraciclina (codificada por *tet*(B)) e sulfonamidas (codificada por *sul*2) a ser induzida pelos mesmos genes da variante europeia, ao passo que os genes associados à variante espanhola (e a elementos genéticos móveis) que poderiam induzir o mesmo padrão de resistência (*aadA* para a estreptomicina, *tet*(A) para a tetraciclina e *sul*1 para as sulfonamidas) não foram amplificados. Para confirmar a relação entre os isolados e a variante europeia seria necessário avaliar a clonalidade entre estirpes, possivelmente através da comparação entre padrões de PFGE e determinação do grau de semelhança através de UPGMA.

A presença de resistência à combinação amoxicilina-ácido clavulânico em dois dos isolados (FMV A3 e FMV D2), tendo em conta o padrão de resistência apresentado e os genes detetados, encontra-se provavelmente relacionada com algum grau de hiperprodução da beta-lactamase TEM-1, fenómeno previamente descrito em *Enterobacteriaceae* (Wu, Shannon & Philips, 1994). Apesar de a beta-lactamase TEM dos isolados deste trabalho não ter sido sequenciada para identificação, a resistência apenas a amoxicilina é indicadora da presença de TEM-1, e o gene responsável pela beta-lactamase identificada na variante europeia consiste precisamente no *bla*<sub>TEM-1</sub> (Hauser *et al*, 2010). No entanto, a sequenciação dos produtos de amplificação desta enzima é necessária para a confirmação de qual é a enzima presente.

A resistência ao ácido nalidíxico já tinha sido previamente reportada em algumas estirpes da variante europeia (Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010), assim como em estirpes da variante espanhola isoladas em Portugal (Antunes *et al*, 2011). Esta resistência em *Salmonella* encontra-se geneticamente associada à ocorrência de uma mutação pontual na ADN girase (Hopkins *et al*, 2005). A deteção desta mutação apenas é possível através da sequenciação do gene *gyrA*, responsável pela subunidade principal, o que não foi possível incluir no desenho experimental deste trabalho. O estudo de Hauser *et al* (2010) nos clones europeus incluiu no painel de genes a testar os determinantes plasmídicos de resistência às quinolonas *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, e os resultados foram negativos, tal como neste trabalho. É possível que uma outra variante de *qnr* recentemente identificada em *Salmonella*, *qnrD* (Cavaco, Hasman, Xia & Aarestrup, 2009), possa estar presente nestes isolados, dado que os determinantes de resistência a fluoroquinolonas de base plasmídica apenas reduzem o nível de susceptibilidade às fluoroquinolonas como a ciprofloxacina e a enrofloxacin (Hopkins *et al*, 2005), e as CIM da enrofloxacin obtidas neste trabalho são superiores ou

iguais ao limiar inferior de deteção da VetMIC na maioria dos isolados. A presença da resistência ao ácido nalidíxico é preocupante, já que esta representa um degrau na escada para resistência às fluoroquinolonas, e a potencial presença de um gene de origem plasmídica não deve ser descartada, pelo que é recomendada a vigilância da sua disseminação em *Salmonella* em Portugal.

A presença de resistência à neomicina, apesar de previamente descrita em *S. Typhimurium* monofásica (Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010), esta resistência foi apenas encontrada pontualmente, não sendo considerada parte do padrão base apresentado pelas estirpes europeias. A neomicina é um aminoglicosídeo de administração sobretudo tópica ou oral, pouco absorvido a nível entérico (Riviere & Papisch, 2009). Apesar de existirem formulações para administração oral em animais de produção como tratamento de diarreias bacterianas, incluindo por *Salmonella*, noutros países (Riviere & Papisch, 2009), em Portugal não existem formulações contendo neomicina como parte do princípio ativo para suínos (<http://www.apifarma.pt/symposiumvet>), constando apenas de uma preparação de aplicação tópica em cães e gatos e uma preparação para administração intra-mamária em bovinos. Os genes de resistência à neomicina codificam enzimas, fosforilases, capazes de inativar o antibiótico, e encontram-se frequentemente associados a plasmídeos (tal como os restantes genes associados à resistência a aminoglicosídeos) (Shaw *et al*, 1993). Dois genes foram encontrados em *Salmonella*, *aphA-1*, presente em 3 das 4 estirpes resistentes a neomicina no estudo de *S. Typhimurium* monofásica de Hauser *et al* (2010), e *aphA-2*, em *S. Weltevreden* (Aarestrup *et al*, 2003). Em Portugal, apesar de ter sido identificada noutras *Enterobacteriaceae* (Machado, Coque, Cantón, Sousa & Peixe, 2008), não se tem conhecimento sobre a existência de resistência à neomicina em *Salmonella*, sendo este o primeiro relato desta resistência no género a nível nacional. Os determinantes genéticos de resistência à neomicina não foram identificados no estudo de Machado *et al* (2008) tal como neste trabalho, pelo que um estudo dos genes de resistência à neomicina presentes a nível nacional e da sua localização poderá lançar alguma luz sobre o panorama nacional e potenciais riscos para a saúde pública.

## 7. Conclusão

Enquanto se utilizarem antibióticos continuar-se-á a exercer pressão para a seleção de bactérias mais e mais resistentes, e, não tendo este ciclo fim à vista, é necessário procurar formas de o poder influenciar. Apesar de haver algum decréscimo dos casos registados na Europa, a salmonelose continua a ser uma das infeções alimentares mais prevalentes a nível europeu e mundial, e a propagação de serovares multirresistentes como a *S. Typhimurium* monofásica deve constituir uma preocupação desde o produtor ao consumidor. A via de transmissão mãe-filho é uma ameaça significativa à saúde pública, sendo uma rota de contaminação de novos hospedeiros com repercussões na carga microbiana do

ambiente da exploração, na persistência da bactéria e na continuação da expansão do serovar 4,[5],12:i:- no reservatório suíno. Outro motivo de preocupação consiste na apresentação subclínica da infeção, sem repercussões visíveis nos animais portadores. Sem sinais observáveis, a probabilidade de não deteção da *Salmonella* e a manutenção da bactéria ao longo do ciclo produtivo poderá ser superior do que em caso de doença clínica, o que levanta a questão de qual será a influência destes animais não detetados na contaminação dos produtos finais e de toda a cadeia produtiva até lá chegarem.

A conclusão deste estudo é que a transmissão de *S. Typhimurium* monofásica após o nascimento existe e é um fenómeno provável. É necessária uma continuação do trabalho desenvolvido no sentido de aprofundar a dinâmica de transmissão deste serovar e do género *Salmonella* em geral no ciclo produtivo dos suínos, e avaliar qual o real impacto desta via de transmissão na segurança alimentar e na saúde humana e animal.

## 8. Bibliografia

- Aanensen, D.M. & Spratt, B.G. (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Research*, 33, wt728-w733. Acedido em Set. 8, 2012, disponível em: [http://nar.oxfordJournals.org/content/33/suppl\\_2/W728.full](http://nar.oxfordJournals.org/content/33/suppl_2/W728.full)
- Aarestrup, F.M., Lertworapreecha, M., Evans, M.C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R.S. & Wegener, H.C. (2003). Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries.
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S. & S. *enterica* MLST study group (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 8 (6). Acedido em Jul. 20, disponível em: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2FJournal.ppat.1002776>
- Agasan, A., Komblum, J., Williams, G., Pratt, C., Fleckenstein, P., Wong, M. & Ramon, A. (2002). Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subspecies I) serotype 4,5,12:- strains causing food-borne infections in New York city. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6), 1924-1929.
- Aldridge, P.D., Wu, C., Gnerer, J., Karlinsey, J.E., Hughes, K.T. & Sachs, M.S. (2006). Regulatory protein inhibits both synthesis and use of the target protein controls flagellar phase variation in *Salmonella enterica*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 103, 11340-11345.
- Alekshun, M.N., Levy, S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128 (6), 1037-1050.
- Amavisit, P., Boonyawiwat, W. & Bangtrakulnont, A. (2005). Characterization of *S. enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (6), 2736-2740.
- Anjum, M.F, Choudhary, S., Morrison, V., Snow, L.C., Mafura, M., Slickers, P., Ehricht, R. & Woodward, M.J. (2011). Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance with *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 550-559.
- Anónimo (2002). *EN ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection of Salmonella spp.* Genebra: ISO.
- Anónimo (2007). *EN ISO 6579:2002/ Amd1: Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of Salmonella spp. – Annex D: detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage.* Genebra: ISO
- Antunes, P., Mourão, J., Pestana, N. & Peixe, L. (2011). Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 10, 1093-1098.
- Babic, M., Hujer, A.M. & Bonomo, R.A. (2006). What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resistance Updates*, 9, 142-156.
- Barton, B.M., Harding, G.P., Zuccarelli, A. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry*, 226, 235-240.

- Belkum, A. van (2007). Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49, 22-27.
- Belœil, P.A., Fravallo, P., Fablet, C., Jolly, J.P., Eveno, E., Hascoet, Y., Chauvin, C., Salvat, G. & Madec, F. (2004). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 63 (1-2), 103-112.
- BIOHAZ (2010). Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal*, 8 (10), 1826-1874.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid ADN. *Nucleic Acids Research*, 7 (6), 1513-1523.
- Boxrud, D., Monson, T., Stiles, T. & Besser, J. (2010) The role, challenges, and support of PulseNet laboratories in detecting foodborne disease outbreaks. *Public Health Reports*, 125 (2), 57-62.
- Boyd, E.F. & Hartl, D.L. (1997). Recent horizontal transmission of plasmids between natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology*, 179 (5), 1622-1627.
- Boyen, F., Haesebrouck, F., Maes, D., Immerseel, F. van, Ducatelle, R. & Pasmans, F. (2008). Non-typhoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Veterinary Microbiology*, 130, 1-19.
- Bülte, M. & Jakob, P. (1995). The use of a PCR-generated *invA* probe for the detection of *Salmonella* spp. in artificially and naturally contaminated foods. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 335-344.
- Burnens, A.P., Stanley, J., Sack, R., Hunziker, P., Brodard, I. & Nicolet, J. (1997). The flagellin n-methylase gene *fliB* and an adjacent serovar specific IS200 element in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology*, 143, 1539-1547.
- Caleja, C., Toro, M. de, Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D., Rodrigues, J., Sáenz, Y., Carvalho, C., Igrejas, G., Torres, C. & Poeta, P. (2011). Antimicrobial resistance and class I integrons in *Salmonella enterica* isolates from wild boards and Bísaro pigs. *International Microbiology*, 14, 19-24.
- Carattoli, A. (2003). Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Current Issues in Molecular Biology*, 5, 113-122.
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (6), 2227-2238.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Fallbo, V., Hopkins, K.L. & Threlfall, E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 219-228.
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A. & García-Gimeno, R.M. (2011). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: a review. *Food Research International* [article in press]. Acedido em Fev. 2, 2012, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>

- Carriço, J.A., Pinto, F.R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N.G., Frazão, N., Lencastre, H. de & Almeida, J.S. (2005). Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (11), 5483-5490.
- Cavaco, L.M., Hasman, H., Xia, S. & Aarestrup, F.M. (2009). *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2), 603-608.
- CDC (2010a). Multistate outbreak of human *Salmonella* Typhimurium infections associated with pet turtle exposure – United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59 (7), 191-196.
- CDC (2010b). *Salmonella* Montevideo infections associated with salami products made with contaminated imported black and red pepper – United States, July 2009 – April 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59 (50), 1647-1650.
- Centeno, M.M.G.F.L. (2010). *Influência do uso de fluoroquinolonas no aparecimento de Escherichia coli e Salmonella spp. multirresistentes em vitelos*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Cerro, A. del, Soto, S.M. & Mendoza, M.C. (2003). Virulence and antimicrobial-resistance gene profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. *Food Microbiology*, 20, 431-438.
- Chaslus-Dancla, E., Martel, J.L., Carlier, C., Lafont, J.P. & Courvalin, P. (1986). Emergence of aminoglycoside 3-N-acetyltransferase IV in *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium isolated from animals in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29 (2), 239-243.
- Chiu, C.H., Su, L.H., Chu, L.H., Wang, M.H., Yeh, C.M., Weill, F.X. & Chu, C. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage types DT 102, DT 104, and U302 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (7), 2354-2358.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (2), 232-260.
- CLSI (2006). *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement M100-S19*. Wayne, PA: CLSI.
- CLSI (2008). *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals – Third Edition: approved standard M31-A3*. Wayne, PA: CLSI.
- Coburn, B., Grassl, G.A. & Finlay, B.B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85, 112-118.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (2010). *Groupe de travail : antibiogramme veterinaire du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*. Acedido em Nov. 12, 2011, disponível em [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/CASFMVET\\_2010.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/CASFMVET_2010.pdf)

- Domingos, I.C.S. (2010). *Prevalências, serotipos e susceptibilidade a antibióticos de Salmonella spp. em explorações de suínos em Portugal*. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- ECDC (2011). *Annual epidemiological report 2011: reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data*. Estocolmo: ECDC
- Echeita, M.A., Aladueña, A., Cruchaga, S. & Usera, M.A. (1999). Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (10), 3425.
- Echeita, M.A., Herrera, S. & Usera, M.A. (2001). Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* strain 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (8), 2981-2983.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I. & Sratchounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* in Russian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (12), 3724-3732.
- EFSA (2008). Report on the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 135, 1-111.
- EFSA (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 7 (12), 1377-1470.
- EFSA & ECDC (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10 (3), 2597-3039.
- Fàbrega, A., Sánchez-Céspedes, J., Soto, S. & Villa, J. (2008). Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 83, 307-315.
- Fluit, A.C. (2005). Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*?. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 1-11.
- Foley, S.L. & Lynne, A.M. (2008). Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*, 86, 173-187.
- Funk, J.A., Davies, P.R. & Nichols, M.A. (2001). Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Veterinary Microbiology*, 83(1), 45-60.
- Funk, J. & Gebreyes, W.A. (2004). Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health and Production*, 12 (5), 246-251.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J. & Immerseel, F. van (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (4), 718-738.
- Garaizar, J., Porwollik, S., Echeita, A., Rementeria, A., Herrera, S., Wong, R.M., Frye, J., Usera, M.A., McClelland, M. (2002). ADN microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6), 2074-2078.

- Gatto, A.J., Peters, T.M., Green, J., Fisher, I.S., Gill, O.N., O'Brien, S.J., Maguire, C., Berghold, C., Lederer, I., Gerner-Smidt, P., Torpdahl, M., Siitonen, A., Lukinmaa, S., Tschäpe, H., Prager, R., Luzzi, I., Dionisi, A. M., Zwaluw, W.K. van der, Heck, M., Coia, J., Brown, D., Usera, M., Echeita, A. & Threlfall, E.J. (2006). Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiology and Infection*, 134 (4), 726-736.
- Gay, K., Robicsek, A., Strahilevitz, J., Park, C.H., Jacoby, G., Barrett, T. J., Medalla, F., Chiller, T. M. & Hooper, D. C. (2006) Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 297-304.
- Gebreyes, W.A. & Altier, C. (2002). Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (8), 2813-2822.
- Gebreyes, W.A., Thankur, S., Dorr, P., Tadesse, D.A., Post, K. & Wolf, L. (2009). Occurrence of *spvA* virulence gene and clinical significance for multidrug-resistant *Salmonella* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (3), 777-780.
- Gomes-Neves, E., Antunes, P., Tavares, A., Themudo, P., Cardoso, M.F., Gärtner, F., Costa, J.M. & Peixe, L. (2012). *Salmonella* cross-contamination in swine abattoirs in Portugal: carcasses, meat and meat handlers. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 82-87.
- Gopinath, S., Carden, S. & Monack, D. (2012). Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends in Microbiology*, 20 (7), 320-328.
- Grimont, P.A. & Weill, F.X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. (9<sup>a</sup> Edição). Paris: WHOCC-Salm.
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.M., Olsen, J.E. & Dalsgaard, A. (2000). Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 929-936.
- Guerra, B., Laconcha, I., Soto, S., Gonzalez-Hevia, M.A. & Mendoza, M.C. (2000). Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 341-347.
- Gunell, M., Webber, M.A., Kotilainen, P., Lilly, A.J., Caddick, J.M., Jalava, J., Huovinen, P., Siitonen, A., Hakanen, A.J. & Piddock, L.J. (2009). Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (9), 3832-3836.
- Hauser, E., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Blank, K., Prager, R., Rabsch, W., Appel, B., Fruth, A. & Malorny, B. (2010). Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (14), 4601-4610.
- Hendriksen, S.W., Orsel, K., Wagenaar, J.A., Miko, A. & Duijkeren, E. van (2004). Animal-to-human transmission of *Salmonella* Typhimurium DT104A variant. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (12), 2225-2227.
- Hollingshead, S. & Vapnek, D. (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. *Plasmid*, 1, 17-30.



- Hopkins, K.L., Davies, R.H. & Threlfall, E.J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 358-373.
- Hopkins, K.L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S.A., Lucarelli, C., Porrero, M.C., Jakubczak, A., Threlfall, E.J. & Mevius D.J. (2010). Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain?. *Eurosurveillance*, 15 (22). Acedido em Dez. 9, 2011, disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19580>
- Hunter, S.B., Vauterin, P., Lambert-Fair, M.A., Duyne, M.S., Kubota, K., Graves, L., Wrigley, D., Barrett, T. & Ribot, E. (2005). Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (3), 1045-1050.
- Hur, J., Jawale, C. & Lee, J.H. (2011). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. *Food Research International* [article in press], acedido em Fev. 17, 2012, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911003139>.
- Ido, N., Kudo, T., Sasaki, K., Motokawa, M., Iwabuchi, K., Matsudate, H., Seimiya, Y.M. & Akiba, M. (2011). *Journal of Veterinary Medical Science*, 73 (2), 241-244.
- Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A. & Hooper, D.C. (2006). *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (4), 1178-1182.
- Kehrenberg, C., Friederichs, S., Jong, A. de, Michael, G.B. & Schwarz, S. (2006). Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 18-22.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G. & Achtman, M. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*, 2 (1), 39-45.
- Kim, H. & Bhunia, A.K. (2008). SEL, a selective enrichment broth for simultaneous growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (15), 4853-4866.
- Krunker, S., Alban, L., Boes, J. & Dahl, J. (2003). Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (6), 2282-2288.
- Kurosawa, A., Imamura, T., Tanaka, K., Tamamura, Y., Uchida, I., Kobayashi, A., Hata, E., Kanno, T., Akiba, M., Yukawa, S. & Tamura, Y. (2012). Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. *Veterinary Microbiology* [article in press]. Acedido em Jul. 20, 2012, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.023>
- Levin, R.E. (2009). The use of molecular methods for detecting and discriminating *Salmonella* associated with foods – a review. *Food Biotechnology*, 23 (4), 313-367.

- Liebana, E., Garcia-Migura, L., Clouting, C., Clifton-Hadley, F.A., Lindsay, E., Threlfall, E.J., McDowell, S.W. & Davies, R.H. (2002). Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (12), 4450-4456.
- Lindstedt, B.A.; Heir, E.; Gjernes E. & Kapperud, G. (2003). ADN fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (4), 1469-1479.
- Long, S.G., DuPont, H.L., Gaul, L., Arafat, R.R., Selwyn, B.J., Rogers, J. & Casey, E. (2010). Pulsed-field gel electrophoresis for *Salmonella* infection surveillance, Texas, USA, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (6), 983-985.
- Lucarelli, C., Dionisi, A.M., Torpdahl, M., Villa, L., Graziani, C., Hopkins, K., Threlfall, J., Caprioli, A. & Luzzi, I. (2010). Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark and the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (6), 2103-2109.
- MacGowan, A. (2011). Revisiting beta-lactams – PK/PD improves dosing of old antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology*, 11, 470-476.
- Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C. & Peixe, L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 296-302.
- Machado, J. & Bernardo, F. (1990). Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 477-480.
- Madec, J.Y., Doublet, B., Ponsin, C., Cloaekaert, A. & Haenni, M. (2011). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene carried on an Inc11 plasmid in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 in cattle in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (4), 942-944.
- Madsen, L., Aarestrup, F.M. & Olsen, J.E. (2000). Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary Microbiology*, 75, 73-82.
- Malachowa, N., Sabat, A., Gniadkowski, M., Krzyszton-Russjan, J., Empel, J., Miedzobrozki, J., Kosowska-Shick, K., Appelbaum, P.C. & Hryniewicz, W. (2005). Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, *spa* typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (7), 3095-3100.
- Malorny, B., Hoorfar, J., Bunge, C. & Helmuth, R. (2003). Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (1), 290-296.
- Mastroeni, P. & Maskell, D. (2006). *Salmonella Infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S. & Harel, J. (2003). Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (10), 3214-3221.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A. & Davies, J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (6), 1568-1574.
- McDougal, L.K., Steward, C.D., Killgore, G.E., Chaitram, J.M., McAllister, S.K. & Tenover, F.C. (2003). Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (11), 5113-5120.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A. & Helmuth, R. (2005). Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 1025-1033.
- Millemann, Y., Lesage, M.C., Chaslus-Dancla, E. & Lafont, J.P. (1995). Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (1), 173-179.
- Mody, R.K, Greene, S.A., Gaul, L., Sever, A., Pichette, S., Zambrana, I., Dang, T., Gass, A., Wood, R., Herman, K., Cantwel, L.B., Falkenhorst, G., Wannemuehler, K., Hoekstra, R.M., McCullum, I., Cone, A., Franklin, L., Austina, J., Delea, K., Behraves, C.B., Sodha, S.V., Yee, J.C., Emanuel, B., Al-Khaldi, S.F., Jeffeson, V., Williams, I.T., Griffin, P.M. & Sverdlow, D.L. (2011). National outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections: importance of Texas restaurant investigations in implicating jalapeño peppers. *PLoS One*, 6 (2). Acedido em Fev. 10, 2012, disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2FJournal.pone.0016579>
- Monack, D.M. (2012). *Salmonella* persistence and transmission strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 15, 100-107.
- Nauerby, B., Pedersen, K., Dietz, H.H. & Madsen, M. (2000). Comparison of Danish isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT9a and PT11 from hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and humans by plasmid profiling and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (10), 3631-3635.
- Navia, M.M., Ruiz, J., Sanchez-Cespedes, J. & Vila, J. (2003). Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46, 295-298.
- Ng, L.K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G.A. & Johnson, W. (1999). Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (12), 3018-3021.
- Nollet, N., Houf, K., Dewulf, J., Kruif, A. de, Zutter, L. de & Maes, D. (2005). *Salmonella* in sows: a longitudinal study in farrow-to-finish pig herds. *Veterinary Research*, 36 (4), 645-656. Acedido em Set. 9, 2012, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2005022>
- Ohl, M.E. & Miller, S.I. (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 52, 259-274.

- Olive, D.M. & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for ADN-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6), 1661-1669.
- Oliveira, C.J., Garcia, T.B., Carvalho, L.F. & Givisiez, P.E. (2007). Nose-to-nose transmission of *Salmonella* Typhimurium between weaned pigs. *Veterinary Microbiology*, 125, 355-361.
- Olliaro, P. (2001). Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 89, 207-219.
- Organização Mundial de Saúde (2005). Drug-resistant salmonella. *Fact sheet nº139*. Acedido online em Set. 10, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
- Pomba, C., Mendonça, N., Costa, M., Louro, D., Baptista, B., Ferreira, M., Correia, J.D. & Caniça, M. (2006). Improved multiplex PCR method for the rapid detection of  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* of animal origin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56, 103-106
- Pomba, C., Fonseca, J.D. da, Baptista, B.C., Correia, J.D. & Martínez-Martínez, L. (2009). Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the *qnrB2* and *aac(6')-Ib-cr* genes in a dog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (1), 327-328.
- Pui, C.F., Wong, W.C., Chai, L.C., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Hidayah, M.S., Ubong, A., Farinazleen, M.G., Cheah, Y.K. & Son, R. (2011). *Salmonella*: a foodborne pathogen. *International Food Research Journal*, 18, 465-473.
- Quin, P.J., Certer M.E., Markey B. & Carter G. R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Londres: Mosby.
- Rabsch, W., Andrews, H.L., Kingsley, R.A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L.G. & Bäumler, A.J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infections and Immunity*, 70 (5), 2249-2255.
- Randall, L.P., Cooles, S.W., Osborn, M.K., Piddock, L.J. & Woodward, M.J. (2004). Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 208-216.
- Riviere, J.E. & Papich, M.G. (2009). *Veterinary Pharmacology & Therapeutics* (9ª edição). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K. & Hooper, D. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12, 83-88.
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. & Torres, C. (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (10), 3996-4001.
- Salehi, T.Z., Mahzounieh, M. & Saeedzadeh, A. (2005). Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *International Journal of Poultry Science*, 4 (8), 557-559.

- Schmidt, T., Friehs, K., Schleef, M., Voss, C. & Flaschel, E. (1999). Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 274, 235-240.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 519-542.
- Shahada, F., Amamoto, A., Chuma, T., Shirai, A. & Okamoto, K. (2007). Antimicrobial susceptibility phenotypes, resistance determinants and ADN fingerprints of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from bovine in Southern Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 150-156.
- Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R. & Khan, A.U. (2008). Aminoglycosides versus bacteria – a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial background. *Journal of Biomedical Science*, 15, 5-14.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. & Miller, G.H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57 (1), 138-163.
- Soyer, Y., Switt, A.M., Davis, M.A., Maurer, J., McDonough, P.L., Schoonmaker-Bopp, D.J., Dumas, N.B., Root, T., Wamick, L.D., Gröhn, Y.T. & Wiedmann, M. (2009). *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (11), 3546-3556.
- Spinosa, H.S., Górnaiak, S.L. & Bernardi, M.M. (2006). *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* (4ª edição), Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan.
- Stubbs, A.D., Hickman-Brenner, F.W., Cameron, D.N. & Farmer, J.J. (1994). Differentiation of *Salmonella Enteritidis* phage type 8 strains: evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (1), 199-201.
- Switt, A.I., Soyer, Y., Warnick, L.D. & Wiedmann, M. (2009). Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (4), 407-415.
- Tannock, G.W., Fuller, R., Smith, S.L. & Hall, M.A. (1990). Plasmid profiling of members of the family *Enterobacteriaceae*, lactobacilli and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (6), 1225-1228.
- Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C. & Fernandes, S.A. (2004). "Multiplex PCR" identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in São Paulo state, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo*, 46 (2), 115-117.
- Tavechio, A.T., Fernandes, S.A., Ghilardi, A.C., Soule, G., Ahmed, R. & Melles, C.E. (2009). Tracing lineage by phenotypic and genotypic markers in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- and *Salmonella* Typhimurium isolated in state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (7), 1042-1046.

- Tennant, S.M., Diallo, S., Levy, H., Livio, S., Sow, S.O., Tapia, M., Fields, P.I., Mikoleit, M., Tamboura, B., Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Galen, J.E. & Levine, M.M. (2010). Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4 (3). Acedido em Dez. 13, 2011, disponível em: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2FJournal.pntd.0000621>
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (9), 2233-2239.
- Tizard, I. (2004). Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 13 (2), 50-66.
- Torre, E. de la, Zapata, D., Tello, M., Mejia, W., Frías, N., Peña, F.J., Mateu, E.M. & Torre, E. (2003). Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (6), 2395-2400.
- Turner, P.E, Cooper, V.S. & Lenski, R.E. (1998). Tradeoff between horizontal and vertical modes of transmission in bacterial plasmids. *Evolution*, 52 (2), 315-329.
- Vanegas, R.A. & Joys, T.M. (1995). Molecular analyses of the phase-2 antigen complex 1,2 of *Salmonella* spp.. *Journal of Bacteriology*, 177, 3863-3864.
- Veldman, K., Cavaco, L.M., Mevius, D., Battisti, A., Franco, A., Botteldoorn, N., Bruneau, M., Perrin-Guyomard, A., Cerny, T., Escobar, C.F., Guerra, B., Schroeter, A., Gutierrez, M., Hopkins, K., Myllyniemi, A.L., Sunde, M., Wasyl, D. & Aarestrup, F.M. (2011). International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1278-1286.
- Vieira-Pinto, M., Tenreiro, R. & Martins, C. (2006). Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* spp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 77-84.
- Wattiau, P., Boland, C. & Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (22), 7877-7885.
- Weill, F.X., Guesnier, F., Guibert, V., Timinouni, M., Demartin, M., Plomack, L. & Grimont, P.A. (2006). Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (3), 700-708.
- Wu, P.J., Shannon, K. & Phillips, I. (1994). Effect of hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase on in vitro susceptibility of *Escherichia coli* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38 (3), 494-498.
- Xaplanteri, M.A., Andreou, A., Dinos, G.P & Kalpaxis, D.L. (2003). Effect of polyamines on the inhibition of peptidyltransferase by antibiotics: revisiting the mechanism of chloramphenicol action. *Nucleic Acids Research*, 31 (17), 5074-5083.

- Yamamoto, S. & Kutsukake, K. (2006). *fljA*-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 188, 958-967.
- Yan, S.S., Pendrak, M.L., Abela-Ridder, B., Punderson, J.W., Fedorko, D.P., & Foley, S.L. (2003). An overview of *Salmonella* typing: public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4, 189-204.
- Yang, S.J., Park, K.Y., Kim, S.H., No, K.M., Besser, T.E., Yoo, H.S., Kim, S.H., Lee, B.K. & Park, Y.H. (2002). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Veterinary Microbiology*, 86, 295-301.

## Anexo I – Critérios de susceptibilidade aplicados nos testes de susceptibilidade a antibióticos

Tabela 6 - Intervalos de susceptibilidade aplicados nos testes de susceptibilidade a antibióticos

Antibiótico	Teste	Intervalos de Suscetibilidade			Referência
		S	I	R	
Ácido Nalidíxico	Disco	≥ 19 mm	14 - 18 mm	≤ 13 mm	CLSI, 2006
Amoxicilina	Disco	≥ 17 mm	14 - 16 mm	≤ 13 mm	CLSI, 2008
Amoxicilina - Ácido Clavulânico	Disco	≥ 18 mm	14 - 17 mm	≤ 13 mm	CLSI, 2008
Ampicilina	VetMIC	≤ 8 µg/ml	16 µg/ml	≥ 32 µg/ml	CLSI, 2008
Cefotaxima	Disco	≥ 23 mm	15 - 22 mm	≤ 14 mm	CLSI, 2006
Cefoxitina	Disco	≥ 18 mm	15 - 17 mm	≤ 14 mm	CLSI, 2006
Ceftazidima	Disco	≥ 18 mm	15 - 17 mm	≤ 14 mm	CLSI, 2006
Ceftiofur	Disco	≥ 21 mm	18 - 20 mm	≤ 17 mm	CLSI, 2008
Ceftiofur	VetMIC	≤ 2 µg/ml	4 µg/ml	≥ 8 µg/ml	CLSI, 2008
Enrofloxacin	VetMIC	≤ 0.5 µg/ml	1 - 2 µg/ml	≥ 4 µg/ml	CLSI, 2008
Estreptomicina	VetMIC	≤ 8 µg/ml	16 µg/ml	≥ 32 µg/ml	CA-SFM, 2010
Florfenicol	VetMIC	≤ 4 µg/ml	8 µg/ml	≥ 16 µg/ml	CLSI, 2008
Gentamicina	VetMIC	≤ 4 µg/ml	8 µg/ml	≥ 16 µg/ml	CLSI, 2008
Neomicina	VetMIC	≤ 8 µg/ml	16 µg/ml	≥ 32 µg/ml	CA-SFM, 2010
Sulfametoxazol - Trimetoprim	VetMIC	≤ 38/2 µg/ml	—	≥ 76/4 µg/ml	CLSI, 2008
Sulfonamidas Compostas	Disco	≥ 17 mm	13 - 16 mm	≤ 12 mm	CLSI, 2008
Tetraciclina	VetMIC	≤ 4 µg/ml	8 µg/ml	≥ 16 µg/ml	CLSI, 2008
Trimetoprim	Disco	≥ 16 mm	11 - 15 mm	≤ 10 mm	CLSI, 2006





## Anexo II – Diâmetro dos halos de inibição e CIMs dos isolados de *S. 4,[5],12:i:-* das famílias A, B e D

Tabela 7 - Diâmetro dos halos de inibição e CIM dos isolados de *S. 4,[5],12:i:-* das famílias A, B e D

Estirpe	Diâmetro do halo de inibição (mm)									CIM (µg/ml)								
	AML	AMC	CTX	CAZ	FOX	XNL	NA	S3	W	AMP	XNL	N	CN	STR	SxT	ENR	Te	FFC
Porca FMV A	0	19	24	23	25	18	0	0	23	>8	2	>32	≤2	>32	≤0,5/9,5	0,25	>8	8
Leitão FMV A1	0	14	34	30	19	26	11	0	25	>8	2	>32	8	>32	≤0,5/9,5	≤0,125	>8	8
Leitão FMV A2	0	14	32	26	18	25	10	0	23	>8	2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	≤0,125	>8	8
Leitão FMV A3	0	12	28	24	16	21	0	0	22	>8	2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	0,25	>8	8
Leitão FMV A4	0	20	36	31	22	27	12	0	24	>8	2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	0,25	>8	8
Leitão FMV A5	0	20	26	24	24	21	10	0	22	>8	2	>32	≤2	>32	≤0,5/9,5	1	>8	8
Leitão FMV A6	0	19	24	22	22	21	0	0	14	>8	2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	0,25	>8	8
Leitão FMV A7	0	18	35	32	20	26	0	0	20	>8	2	>32	≤2	>32	1/19	1	>8	8
Porca FMV B	0	19	24	22	23	20	13	0	24	>8	2	>32	≤2	>32	≤0,5/9,5	0,5	>8	8
Leitão FMV B2	0	22	31	29	27	26	13	0	23	>8	2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	0,25	>8	8
Leitão FMV B5	0	21	27	26	22	21	0	0	18	>8	2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	0,5	>8	8
Leitão FMV B7	0	20	27	25	25	22	13	0	24	>8	2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	≤0,125	>8	8
Porca FMV D	0	20	27	24	25	21	10	0	23	>8	2	>32	≤2	>32	≤0,5/9,5	0,5	>8	4
Leitão FMV D2	0	12	31	28	20	24	0	0	21	>8	>2	>32	4	>32	≤0,5/9,5	1	>8	8
Leitão FMV D3	0	16	37	31	26	28	10	0	20	>8	2	>32	≤2	>32	1/19	0,5	>8	8
Leitão FMV D4	0	20	27	25	24	20	0	0	21	>8	1	>32	4	>32	≤0,5/9,5	0,25	>8	8
Leitão FMV D5	0	20	26	23	24	21	9	0	24	>8	2	>32	≤2	>32	≤0,5/9,5	0,5	>8	8
Leitão FMV D6	0	20	31	24	24	22	0	0	22	>8	2	>32	≤2	>32	≤0,5/9,5	1	>8	8
Leitão FMV D7	0	15	34	31	20	26	0	0	21	>8	>2	>32	8	>32	1/19	0,5	>8	8

AML- amoxicilina, AMC- amoxicilina-ácido clavulânico, CTX- cefotaxima, CAZ- ceftazidima, FOX- ceftiofur, XNL- ceftiofur, NA- ácido nalidíxico, S3- sulfamidas compostas, W- trimetoprim, AMP- ampicilina, N- neomicina, CN- gentamicina, STR- estreptomicina, SxT- sulfametoxazol-trimetoprim, ENR- enrofloxacin, Te- tetraciclina, FFC- florfenicol.



**Anexo III – Resumo do poster apresentado na 3<sup>rd</sup>ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens 2012, França, em 26 de Junho de 2012**





3<sup>rd</sup> ASM Conference on  
**Antimicrobial Resistance in  
Zoonotic Bacteria and Foodborne  
Pathogens in Animals, Humans,  
and the Environment**

June 26 – 29, 2012  
Aix-en-Provence, France

laboratories for isolation of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. following standard methods. As the isolation rate of *Salmonella* was low, additional isolates were obtained from existing national collections. Agar dilution testing following CLSI guidelines was conducted. Clinical resistance (CR) was assessed based on CLSI breakpoints (M100-S21; M45-A2), decreased susceptibility (DS) was based on epidemiological cut-off values as defined by EFSA. **Results.** For *E. coli* (n=1543), mean CR rates (%) were: ampicillin (A) 32.2; chloramphenicol 16.5; colistin 0.4; gentamicin (G) 1.5; tetracycline (TE) 87.1; trimethoprim/sulfamethoxazole 40.1. DS was for ciprofloxacin (CIP) and cefotaxime (CTX) 4.0 and 0.5%, respectively; CR to these medically important compounds was very low with 0.4 and 0.2%, respectively. For *Salmonella* (n=420), the low prevalence and the variety of different serotypes limited country comparisons. CR was absent for CIP and 0.2% for CTX (1 isolate); DS was 2.9 and 1.7%, respectively. For *C. coli* (n=1193), a minor human pathogen as compared to *C. jejuni*, erythromycin and CIP resistance were 14.8 and 54.6%, respectively. Whilst CR for G was only 1.4%, CR for TE was 77.3%. DS to CIP was absent. Low numbers of *C. jejuni* (n = 20) precluded evaluation of the ABs susceptibility. Among enterococci, *E. faecium* was the most frequently recovered (n=730) and only a few isolates displayed resistance to A, G or vancomycin. However, quinupristin/dalfopristin (Q/D) CR (32.1%) and DS (29.5%) were high. *E. faecalis* (n=163) was intrinsically resistant to Q/D. All enterococci were susceptible to linezolid. **Conclusion.** This survey, based on uniform methodology, shows that antibacterial resistance among enteric organisms in pigs varies between compounds, organisms and countries. Wide variation was apparent with older ABs, but clinical resistance to most new compounds commonly used to treat food-borne disease in humans was usually either absent or very low. Except for Q/D, decreased susceptibility to critically important antibiotics was always low.

## 19A

### VERTICAL TRANSMISSION OF MONOPHASIC SALMONELLA TYPHIMURIUM IN PIGS

**L. Fernandes, M. Centeno, A. Belas, N. Couto, C. Pomba;** Laboratory of Antimicrobial and Biocide Resistance, CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, TUL, Lisbon, PORTUGAL.

**Introduction:** As one of the most common foodborne diseases to this day according to the World Health Organization, salmonellosis continues to be an important subject of study, and one particular serovar of *Salmonella enterica* O 4,[5],12:i:- has become an emergent and rapidly disseminated zoonotic bacteria among food-animals, companion animals and humans worldwide. Little is known on the dynamics of this monophasic *Salmonella* Typhimurium variant in the pig reservoir. **Objectives:** The aim of this study was to determine the likelihood of vertical transmission of monophasic *S. Typhimurium* from sow to piglet. **Methods:** At one industrial pig herd, 10 litters were randomly chosen. Sows and 7 piglets from each respective litter were sampled at birth. *Salmonella* spp. was isolated according to the protocol described in ISO 6579:2002 Annex D and serotyped based on the Kauffmann-White-Le Minor scheme. Confirmation of genus was done through *invA* PCR, and the serotyping results were validated through PCR identification of a 1000 bp IS200 fragment and absence of the second phase flagellar antigen *fljB* as recommended by the EFSA. Susceptibility testing was performed against 13 antimicrobials through the disk diffusion and broth microdilution methods according to CLSI guidelines. Clinical breakpoints were applied to categorized isolates. All isolates were screened for *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-1, *aadA*, *tetA*, *tetB*, *floR*, *sulI*, *dfrIa* antimicrobial resistance genes through PCR. Clonality was assessed by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) with *XbaI* restriction according to the Pulsenet protocol. The definition of a PFGE cluster was based on a similarity cut-off value of 80%

using the unweighted pair group method (UPGMA). **Results:** Three out of the 10 families were positive to monophasic *S. Typhimurium*. In family A all animals were positive (mother and 7 piglets). In family B only the sow and 3 out of 7 piglets were *Salmonella* positive. All except one piglet were found carriers in family C. All monophasic *S. Typhimurium* isolates had a similar resistance pattern amoxicillin-streptomycin-tetracyclin. Exception made for 2 isolates also resistant to florfenicol, 1 to amoxicillin/clavulanate, and 1 simultaneously resistant to both antimicrobials. All *Salmonella* isolates from the 3 families harbored the blaTEM and tetB genes. Analysis obtained by PFGE revealed that all isolates had profiles belonging to the same cluster and family B isolates were indistinguishable. **Conclusion:** This study shows that monophasic *S. Typhimurium* may be transmitted from sow-to-piglet at birth in industrial pig herds. This route of transfer may contribute to the persistence and dissemination of the monophasic *S. Typhimurium* in the pig reservoir. Further studies are needed to fully assess the dynamics of the monophasic *S. Typhimurium* during the entire productive pig life cycle and its impact on food-safety and human and animal health.

## 20A

### SOW-TO-PIGLETS TRANSMISSION OF ESCHERICHIA COLI BLACTX-M-1 AND BLACTX-M-32 GENES: EVIDENCE OF IN VIVO MUTATION?

*M. Centeno, L. Fernandes, N. Couto, A. Belas, C. Pomba; Laboratory of Antimicrobial and Biocide Resistance, CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, UTL, Lisbon, PORTUGAL.*

**Introduction:** Genes encoding CTX-M ESBLs are often located in mobile episomes and associated with IS sequences that enhance their mobility and dissemination. Furthermore, CTX-M-32 differs from CTX-M-1 by a single Asp240-Gly substitution responsible for its increased level of resistance to ceftazidime.

**Objective:** This study aims to characterize

CTX-M-producing *E. coli* strains isolated from sows and respective piglets. **Methods:** Three sows (A, B and C) and their litters were randomly selected from an industrial pig herd. From each litter 7 piglets were randomly chosen. All piglets and sows (n=24) were sampled at the time of birth. Rectal faecal samples were obtained from sows and swab samples from piglets. After enrichment in buffered peptone water, 100µl of bacterial suspension was inoculated on MacConkey agar supplemented with 1.5µg/ml of cefotaxime (CTX). *E. coli* strains resistant to CTX were identified by gadA PCR. The blaCTX-M-1Group genes were identified by PCR in all *E. coli* isolates and the entire genes were sequenced. Clonality was assessed by Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) with XbaI restriction according to the Pulsenet protocol. The definition of a PFGE cluster was based on a similarity cut-off value of 80% using the unweighted pair group method (UPGMA). **Results:** In family A the *E. coli* isolates from the sow and one piglet harboured the blaCTX-M-1 gene, while the other 3 piglets had the blaCTX-M-32 genes (3 were ESBL negative). The *E. coli* isolates from sow B and 2 piglets had the blaCTX-M-32 gene, and 3 piglets the blaCTX-M-1 gene (2 were ESBL negative). *E. coli* CTX-M-producer isolates from families A and B were clonally unrelated. In family C, we found one mother-piglet *E. coli* pair of indistinguishable isolates harbouring the blaCTX-M-1 gene and blaCTX-M-32 gene, respectively. At the same time 5 piglets had blaCTX-M-32 gene but only 2 were clonally related and different from all the others (one piglet was ESBL negative). **Conclusion:** In this study blaCTX-M-1Group sequences and PFGE profiles of *E. coli* commensal isolates between sows and corresponding piglets at birth were compared. The majority of isolates were unrelated suggesting the existence of several *E. coli* lineages in either the sow's intestinal microbiota or in the environment. The blaCTX-M-1 and blaCTX-M-32 genes have been described as possessing identical genetic surroundings with common IS elements, such as ISEcp1. This may facilitate





**Anexo IV – Artigo publicado no *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* em 17 de Agosto, 2012**



J Antimicrob Chemother  
doi:10.1093/jac/dks334

## Immediate after birth transmission of epidemic *Salmonella enterica* Typhimurium monophasic strains in pigs is a likely event

Laura Fernandes<sup>1</sup>, Madalena Centeno<sup>1</sup>, Adriana Belas<sup>1</sup>,  
Telmo Nunes<sup>1</sup>, Paula Lopes Alves<sup>2,3</sup>, Natacha Couto<sup>1</sup>  
and Constança Pomba<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Interdisciplinary Centre of Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Technical University of Lisbon, Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal; <sup>2</sup>Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Av. da República, 2780-157 Oeiras, Portugal; <sup>3</sup>IBET, Apartado 12, 2781-901 Oeiras, Portugal

\*Corresponding author. Tel: +351-21-3652837; Fax: +351-21-3652897; E-mail: cpomba@fmv.utl.pt

**Keywords:** PFGE, plasmids, serovar 4,[5],12:i:–, swine, sow-to-piglet

Sir,  
*Salmonellosis* remains an important foodborne disease to date and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:–, also known as monophasic *Salmonella* Typhimurium, has been rising as a cause of infection in humans and is widely spread among certain animal populations, namely in the pig reservoir.<sup>1–3</sup> Little is known on the dynamics of transmission of this serovar and, as such, our aim in this study was to determine the likelihood of immediate after birth transmission of monophasic *Salmonella* Typhimurium from sow to piglet.

At one large industrial pig herd in Portugal, 10 sows and 7 piglets from each sow's litter were randomly chosen and sampled at birth. *Salmonella* was isolated according to the protocol described in ISO 6579:2002 Annex D and serotyped based on the Kauffmann–White–Le Minor scheme.<sup>2</sup> The genus and the absence of the second-phase flagellar antigen *fljB* were confirmed by PCR, as recommended by the European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards.<sup>2</sup> To determine the likelihood of a sow carrying monophasic *Salmonella* Typhimurium transmitting *Salmonella* to her offspring, Fisher's exact test was employed using R software (<http://www.r-project.org>). Susceptibility to 17 antimicrobials was determined using the disc diffusion and broth microdilution methods (VetMIC Stördjur, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden), and interpreted according to CLSI guideline M31-A3. CLSI M100-S21 susceptibility criteria were used for nalidixic acid. For neomycin,

recommendations from the veterinary working party of the Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology were followed. All isolates were screened for *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *aadA*, *tet*(A), *tet*(B), *floR*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1*, *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* using PCR. Plasmid extraction was performed using standard protocols and the size was determined after linearization with S1 exonuclease. Clonality was assessed by PFGE with XbaI restriction, according to the PulseNet protocol. The patterns were analysed by BioNumerics software using the unweighted pair group method with arithmetic mean and the Dice similarity coefficient. The definition of a pulsed-field type cluster was based on a similarity cut-off value of  $\geq 80\%$  and a subtype on a value of  $\geq 97\%$ .<sup>4</sup>

A total of 10 sows and 70 piglets were sampled, yielding 6 sows and 17 piglets positive for *Salmonella* 4,[5],12:i:–. Among the positive animals, three sows and one or more of the respective piglets carried monophasic *Salmonella* Typhimurium (named as families A, B and D) (Table 1). All offspring from the other three positive sows were negative and one positive piglet descended from a sow negative for monophasic *Salmonella* Typhimurium. All *Salmonella* 4,[5],12:i:– isolates from sows and their respective piglets were further characterized. Two resistance patterns were identified: 17 strains were resistant to ampicillin, neomycin, nalidixic acid, sulphonamides, streptomycin and tetracycline, and 2 strains were additionally resistant to amoxicillin/clavulanate. As for the resistance genes identified, all strains harboured *bla*<sub>TEM</sub>, *tet*(B) and *sul2*, except for a single piglet isolate that was negative for *sul2*. The plasmid linearization yielded a single small plasmid of ~5.6 kbp for all isolates. All isolates belonged to a unique pulsed-field type cluster. Furthermore, 11 strains shared a similar profile representing a subtype with  $>97\%$  similarity when a 2.5% band tolerance setting was used (see Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online).

There was a higher probability of a sow positive for monophasic *Salmonella* Typhimurium having a positive offspring with the same serovar (OR = 16.10,  $P = 0.001$ ). Accordingly, the probability of a piglet having monophasic *Salmonella* Typhimurium was ~16 times higher if it belonged to a positive sow.

Several researchers have reported a high *Salmonella* prevalence in sows and their respective piglets early in life.<sup>1,5</sup> Beyond the food safety risk when the sow ultimately enters the food chain, information on vertical transmission from the sow to her offspring is scarce. One study reported the contradictory fact that *Salmonella* serovars isolated from a sow often differed from those isolated from her piglets.<sup>5</sup> In this study, the similarity of the resistance patterns, the antimicrobial resistance genes detected, the plasmid profiles and the PFGE types support the transmission of monophasic *Salmonella* Typhimurium from sow to piglet during or immediately after birth as a means of *Salmonella* colonization of the newborn's gut. To the best of our knowledge, this constitutes the first report of mother-to-piglet horizontal transmission of monophasic *Salmonella* Typhimurium in pigs. The antimicrobial resistance core profile was similar to

**Table 1.** Characterization of monophasic *Salmonella* Typhimurium isolates obtained from families A, B and D with a positive sow and at least one positive piglet

Sample	Resistance pattern	Antimicrobial resistance genes	Plasmid size (kbp)	Pulsed-field type cluster (XbaI restriction)	Pulsed-field subtype <sup>a</sup>
Sow FMV A	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A1
Piglet FMV A1	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV A2	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A5
Piglet FMV A3	AMC AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV A4	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B)	5.6	A	A
Piglet FMV A5	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV A6	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A3
Piglet FMV A7	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A2
Sow FMV B	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV B2	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV B5	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV B7	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Sow FMV D	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A3
Piglet FMV D2	AMC AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV D3	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A1
Piglet FMV D4	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV D5	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A
Piglet FMV D6	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A6
Piglet FMV D7	AMP NAL NEO STR SUL TET	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>tet</i> (B), <i>sul2</i>	5.6	A	A4

AMC, amoxicillin/clavulanate; AMP, ampicillin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; STR, streptomycin; SUL, sulphonamide compound; TET, tetracycline.

<sup>a</sup>The first pattern identified for a subtype in a type was assigned only a capital letter and the remaining subtypes were named with capital letters and numbers, according to Carriço *et al.*<sup>4</sup>

the chromosomally encoded European highly disseminated clone of monophasic *Salmonella* Typhimurium (ampicillin, streptomycin, sulphonamides and tetracyclines).<sup>3,6</sup> With the continuous rise of antimicrobial resistance in *Salmonella*<sup>1,3,6</sup> and the wide spread of the monophasic serovar, this route of transmission poses an increasingly significant threat to public health, allowing the bacteria to persist and further spread in the swine reservoir. It is also important to mention that the sows and piglets showed no clinical symptoms, increasing the odds of *Salmonella* carriage going undetected throughout the productive cycle. Further studies are needed to fully assess the dynamics of monophasic *Salmonella* Typhimurium during the entire productive pig life cycle, and its impact on food safety and human and animal health.

## Funding

This work was supported by project PTDC/SAU-SAP/113651/2009 from Fundação para a Ciência e Tecnologia, Lisbon, Portugal.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

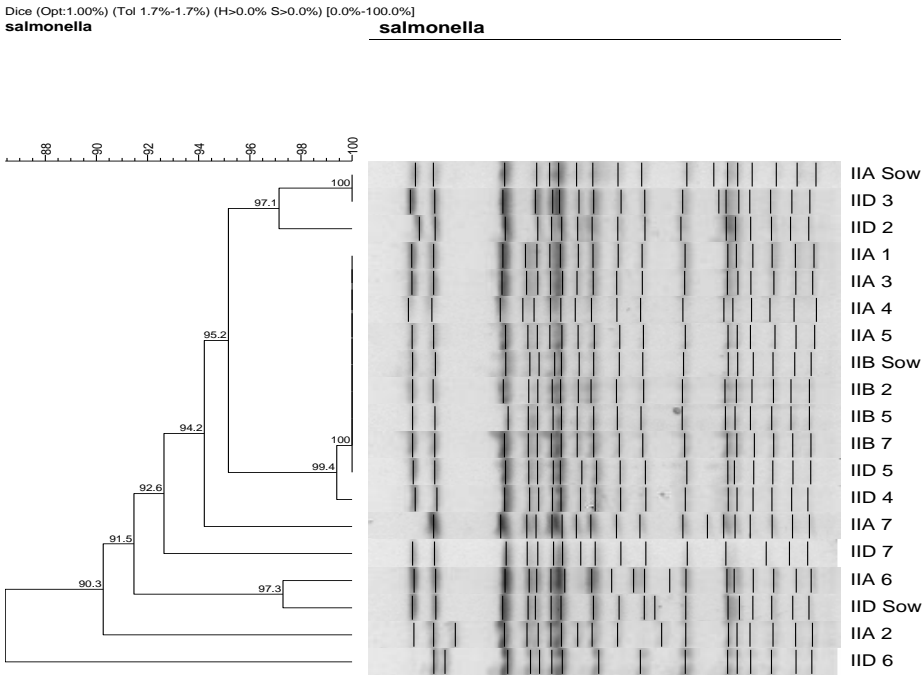
Figure S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- 1 Soyer Y, Switt AM, Davis MA *et al.* *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:–, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3546–56.
- 2 EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal* 2010; **8**: 1826.
- 3 Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B *et al.* Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:– in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill* 2010; **15**: pii=19580.
- 4 Carriço A, Pinto FR, Simas C *et al.* Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5483–90.
- 5 Funk JA, Davies PR, Nichols MA. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. *Vet Microbiol* 2001; **83**: 45–60.
- 6 Lucarelli C, Dionisi AM, Torpdahl M *et al.* Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 2103–9.

**Figure S1.** PFGE profile characterization among serovar 4,[5],12:i:- isolates from pig families A, B and D. (a) Pulsed field type cluster determination using a Dice similarity coefficient with an optimization of 1% and a band tolerance setting of 1.7%. (b) Pulsed- field subtype determination using a Dice similarity coefficient with an optimization of 1% and a band tolerance setting of 2.5%.

(a)



(b)

